



UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE CATALUNYA
BARCELONATECH

Escola Superior d'Agricultura de Barcelona



Influència de les condicions de cultiu en les taxes d'eliminació de N i P de la macroalga *Ulva ohnoi*

Alumne: Nerijus Klimaitis

Tutor: Joan Oca Baradad

Castelldefels, Setembre de 2016

Resum

La producció aquícola està en continu creixement i augmenta al voltant del 10% anualment. A causa d'aquest fet s'ha multiplicat l'abocament de nutrients i matèria orgànica en els últims anys i ha anat agafant força l'aquicultura multitròfica integrada per tal de disminuir l'impacte ambiental aprofitant els nutrients i la matèria orgànica per al cultiu d'espècies amb interès comercial.

El desenvolupament d'aquest treball es centra en un sistema aquícola amb recirculació associat al cultiu de la macroalga *Ulva ohnoi* i s'estudien els beneficis de combinar un cultiu d'algues i peixos en l'eliminació de nutrients dissolts els quals són excretats pels peixos i aprofitats per les algues en el seu creixement.

Es comparen les taxes d'eliminació de nitrogen i fòsfor quan hi ha entrada continua d'aigua en un tanc i quan no la hi ha. També s'estudia com afecta la il·luminació, la densitat de cultiu i les taxes de renovació d'aigua en la quantitat de nitrogen i fòsfor eliminat.

Amb els resultats obtinguts de les taxes d'eliminació s'estima que aproximadament el 70% de l'eliminació de N i P correspon a l'assimilació de l'alga recol·lectada i la resta s'assimila pel fitoplàncton, pel "biofouling" que es produeix en el mateix tanc o pels petits fragments que surten del tanc. També s'observa la importància de la disponibilitat de CO₂ inorgànic tant en les taxes d'eliminació com en el creixement de l'alga. A més, treballant amb densitats molt properes a l'optima sembla que l'alga té la tendència d'acumular N quan disminueix la irradiació rebuda a causa de l'auto-ombreig.

Per últim, s'analitza l'evolució diürna i nocturna de l'oxigen dissolt i el pH en els tancs d'algues i s'estima que, en un sistema amb recirculació associat a un cultiu d'algues l'aportació d'oxigen dissolt és de 0,67 g O₂ m⁻² d⁻¹ i que els peixos aporten al voltant de 2,4 g CO₂ m⁻² d⁻¹ als tancs d'algues.

Resumen

La producción acuícola está en continuo crecimiento y aumenta alrededor del 10% anualmente. Debido a este hecho se ha multiplicado el vertido de nutrientes y materia orgánica en los últimos años y ha ido cogiendo fuerza la acuicultura multitrofica integrada para disminuir el impacto ambiental aprovechando los nutrientes y la materia orgánica para el cultivo de especies de interés comercial.

El desarrollo de este trabajo se centra en un sistema acuícola con recirculación asociado al cultivo de la macroalga *Ulva Ohnoi* y se estudian los beneficios de combinar un cultivo de algas y peces en la eliminación de nutrientes disueltos excretados por los peces y aprovechados para el crecimiento de las algas.

Se comparan las tasas de eliminación de nitrógeno y fósforo cuando hay entrada continua de agua en un tanque y cuando no la hay. También se estudia cómo afecta la iluminación, la densidad de cultivo y las tasas de renovación de agua en la cantidad de nitrógeno y fósforo eliminado.

Con los resultados obtenidos de las tasas de eliminación se estima que aproximadamente el 70% de la eliminación de N y P corresponde a la asimilación del alga recolectada y la resta se asimila por el fitoplancton o por "biofouling" que se produce en el mismo tanque o por los pequeños fragmentos que salen del tanque. También se observa la importancia de la disponibilidad de CO₂ inorgánico tanto en las tasas de eliminación como en el crecimiento del alga. Además, trabajando con densidades muy próximas a la óptima parece que el alga tiende a acumular N cuando disminuye la irradiación recibida a causa del "self-shading".

Por último, se analiza la evolución diurna y nocturna del oxígeno disuelto y el pH en los tanques de algas y se estima que, en un sistema de recirculación asociado a un cultivo de algas, la aportación de oxígeno disuelto es de 0,67 g O₂ m⁻² d⁻¹ i que los peces aportan aproximadamente 2,4 g CO₂ m⁻² d⁻¹ a los tanques de algas.

Abstract

Aquaculture production is increasing about 10% annually. That's why the effluents with nutrients and organic matter increases in recent years and consequently integrated multitrophic aquaculture started gain strength for reduce the environmental impact using the organic matter and nutrients for grow up species of commercial interest.

The development of this work focuses on a recirculating aquaculture system associated with the cultivation *Ulva Ohnoi* and the benefits of combining a culture of algae and fish on the dissolved nutrients uptake. That nutrients are excreted by fish and utilized by algae for grow.

There's a comparison of nitrogen and phosphorus uptake comparing continuous and not continuous water flow in a tank. It also studies the effect of lighting intensity, stocking density and water flow rate on nitrogen and phosphorus removed rate.

With the results of elimination rates is estimated that approximately 70% of N and P is assimilated by the collected algae and the rest is assimilated by fragments of algae that gets out of tank with the water flow, by phytoplankton or biofouling that grows in the same tank. Also is observed the importance of the availability of inorganic carbon in elimination rates and growth and working close the optimum stocking density increases the accumulation of N when self-shading becomes more important.

Finally, day and night evolution of dissolved oxygen and pH are analysed in the algae tanks. And is estimated the oxygen and carbon dioxide earned ($0,67 \text{ g O}_2 \text{ m}^{-2} \text{ d}^{-1}$ and $2,4 \text{ g CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ d}^{-1}$) by the algae-fish association in a recirculation system.

Agraïments

A la meva família per animar-me a estudiar el que m'agrada i recolzar-me en tot moment; a **Joan Oca** per la comprensió, la paciència, l'ajuda, les hores invertides i sobretot per fer-me descobrir el món de l'aqüicultura integrada; a **Ingrid Masaló** pels consells i la seva ajuda en tot moment; a **María Rodríguez**, **María Julià** i sobretot a **Patricia Jiménez** per l'ajuda amb els anàlisis químics i el material de laboratori; a **Jordi Valero** per l'ajuda amb els anàlisis estadístics; a **Samuel Machado** per ser un company i amic en el laboratori; als meus amics per tranquil·litzar-me en els moments d'estrès.

Continguts

1. INTRODUCCIÓ	8
1.1. Les macroalgues	8
1.1.1. Algues vermelles.....	8
1.1.2. Algues Brunes	9
1.1.3. Algues verdes	9
1.2. La reproducció de les macroalgues	10
1.3. Factors que influeixen en el creixement d'Ulva.....	11
1.3.1. La temperatura	11
1.3.2. La densitat de cultiu	11
1.3.3. La irradiació	12
1.3.4. La salinitat.....	12
1.3.5. Els nutrients; nitrogen i fòsfor	13
1.4. Aplicacions d'Ulva	13
1.5. Aquicultura multitròfica integrada.....	13
1.6. Característiques específiques d'un RAS integrat amb algues	14
1.7. Objectius.....	17
2. MATERIAL I MÈTODES	18
2.1. Instal·lació	18
2.2. Disseny experimental	19
2.2.1. Comparació de dos procediments per l'obtenció de la taxa d'eliminació de nutrients	20
2.2.2. Influència de la il·luminació en la taxa d'eliminació	21
2.2.4. Influència de la densitat de cultiu de les algues en la taxa d'eliminació de nutrients	21
2.2.5. Influència de la taxa de renovació d'aigua en l'eliminació de nutrients i en el creixement	21
2.2.6. Monitoratge de l'oxigen dissolt i pH en un tanc d'algues i estimació de l'intercanvi d'oxigen i diòxid de carboni entre els tancs d'algues i peixos.....	22
2.3. Mètodes analítics.....	22
2.3.1. Determinació del creixement fresc	22
2.3.2. Anàlisi d'aigua	22

2.4. Càlculs realitzats	29
2.4.1 Creixement	29
2.4.2. Balanços de matèria	30
3. RESULTATS I DISCUSSIÓ	31
3.1. La determinació de les taxes d'eliminació de nutrients en un cultiu de <i>Ulva ohnoi</i> associat a un sistema de recirculació aquícola.....	31
3.1.1. Comparació de procediments per l'obtenció de la taxa d'eliminació de nutrients	31
3.1.2 Influència de la il·luminació en la taxa d'eliminació	34
3.1.3. Influència de la densitat de cultiu de les algues en la taxa d'eliminació de nutrients i el creixement.....	35
3.1.4. Influència de la taxa de renovació d'aigua en l'eliminació de nutrients i en el creixement ...	38
3.1.5. Monitoratge d'un tanc amb <i>Ulva ohnoi</i>	40
4. CONCLUSIONS	43
5. BIBLIOGRAFIA	44

1. Introducció

1.1. Les macroalgues

Les macroalgues són un conjunt de vegetals tal·lòfits (cos vegetatiu no diferenciat en arrel, tija o fulles, i mancat de veritables teixits) que desenvolupen el seu cicle biològic en medi aquàtic, proveïts de pigments fotosintetitzadors els quals permeten una nutrició autòtrofa i que en alguna fase del seu cicle de vida romanen fixats al substrat marí, creant biòtops litorals més o menys homogenis.

La classificació de les macroalgues marines es realitza fonamentalment atenent la diferenciació de pigments fotosintètics acompanyants de la clorofil·la A, comú per tots els grups, es poden distingir tres grans unitats (Lee, 2008):

1.1.1. Algues vermelles: amb clorofil·la D (*Rhodophyta*).

Són pluricel·lulars majoritàriament i morfològicament molt diverses, dominant els nematotal·lus (tal·lus formats per filaments que poden presentar creixement terminal o intercalar) i cladotal·lus (tal·lus formats per un eix o diversos amb creixement terminal indefinit) (Tormo, 2016). Es distribueixen en tots els oceans, encara que són més abundants a les aigües càlides i tropicals i per la seva especial composició en pigments són capaços de colonitzar ambients molt poc il·luminats, com les aigües profundes o les esquerdes i coves litorals, on poden arribar a ser les úniques algues presents. Les parets cel·lulars de les algues vermelles presenten cel·lulosa i diversos polisacàrids mucilaginosos (ficocol·loides), que serveixen per lligar les cèl·lules i compactar el tal·lus. Aquests ficocol·loides són diferents polímers de la galactosa, entre els quals destaquen l'agar i les carraguenines, per les seves interessants aplicacions industrials.



Figura 1. Alga vermella *Phycodrys rubens* (Silverside, 2016).

1.1.2. Algues Brunas: amb clorofil·la C (*Heterokontophyta*, *Haptophyta*, *Cryptophyta* i *Dinophyta*).

Són espècies bentòniques de gran diversitat morfològica i podem trobar entre elles des d'espècies pluricel·lulars filamentoses i molt senzilles (*Ectocarpus*), fins a les espècies d'algues com les laminarials (*Macrocystis*, *Laminaria*) que han assolit la major grandària i grau de complexitat morfològica dins de les algues marines. Tenen una gran representació en els mars temperats i freds de tots dos hemisferis, formant sobre les roques litorals grans "praderies" o "boscos". Al Pacífic *Macrocystis pyrifera* pot arribar a desenes de metres i els seus tal·lus, que es fixen a les roques a més de 50 metres de profunditat, emergeixen en superfície i constitueixen grans masses flotants que serveixen de recer a diversos animals marins. Altres algues flotants pertanyen al gènere *Sargassum*, entre les quals algunes espècies viuen soltes.



Figura 2. Alga bruna *Dictyota dichotoma* (Brattenborg, 2016)

1.1.3. Algues verdes: amb clorofil·la B (*Euglenophyta* i *Chlorophyta*).

Són molt variades quant a morfologia, cicles biològics i ambients que poden colonitzar. Alguns ordres són exclusius d'aigües dolces (*Zygnematales* i *Desmidiaceae*), altres, com *Halimeda*, *Bryopsidales* i *Dasycladales*, ho són d'aigües marines, mentre que altres, com *Cladophorales* i *Ulva*, es poden trobar en tots dos. Les algues verdes són de morfologia molt variable, des de formes senzilles filamentoses, més o menys ramificades (*Cladophora*), laminars (*Ulva*) o discoïdals (*Ulva*), fins a estructures complexes de tipus sifonal (*Codium*). Dins d'aquest grup taxonòmic i en el camp de les macroalgues marines d'interès econòmic destaquen les espècies de *Ulva*, exclusives d'aigües marines i salobres. Són de morfologia molt senzilla,



Figura 3. Alga verda *Ulva ohnoi*.

tal·lus tubulars de diàmetre variable, ramificats o no, i més o menys aplanats o tal·lus laminars ("enciam de mar") de morfologia variada formada per dues capes de cèl·lules. Les espècies d'*Ulva* proliferen en ambients il·luminats i amb excés de nutrients, per aquest motiu abunden en zones portuàries. També són les algues formadores de les mares verdes (APROMAR, 2014).

1.2. La reproducció de les macroalgues

Les macroalgues presenten dos grans grups de reproducció:

- La reproducció asexual: consisteix en el despreniment de fragments pluricel·lulars (fragmentació) o bé espores germinals (esporulació), que tenen la capacitat de regenerar un nou individu pluricel·lular idèntic a partir d'una única cèl·lula.
- La reproducció sexual: consisteix en la fusió de dues cèl·lules especialitzades (gàmetes), provinents d'individus diferents.

Una mateixa espècie d'alga pot presentar els dos mecanismes de reproducció, quan això succeeix parlem de cicles digenètics. El cicle de vida d'*Ulva ohnoi*, mostrat a la Figura 4, la reproducció asexual només té lloc en individus haploides i la reproducció sexual té lloc quan es fusionen dos gàmetes d'individus diferents (haploides) i es forma el zigot diploide el qual, amb successives mitosis, forma l'esperòfit el qual forma les espores haploides per meiosi. Les espores formen el gametòfit el qual es pot reproduir asexualment o tornar a iniciar el cicle.

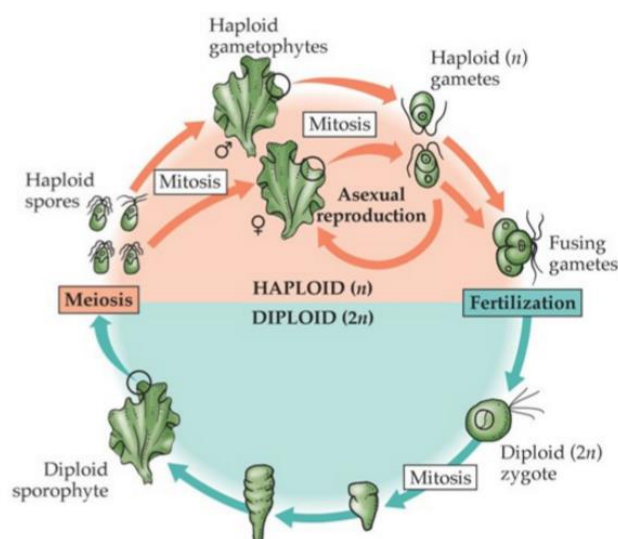


Figura 4. Cicle de vida d'*Ulva*. (Richard, 2015)

1.3. Factors que influeixen en el creixement d'Ulva

El gènere *Ulva*, de les algues verdes, és cosmopolita i això s'atribueix a la seva tolerància a una àmplia gamma d'entorns i la seva gran capacitat de reproducció (Smith, 1947). En el medi natural, el creixement de les algues marines es veu afectat per diversos factors químics, físics i biològics (Pedersen et al., 2004). A la vegada, la taxa de creixement d'algues conreades també s'ha demostrat que depèn de paràmetres ambientals com ara la temperatura, el subministrament de nutrients, la densitat de cultiu, la irradiació i la salinitat (Luning, 1990; Lobban i Harrison, 1994). A més, el pH i la disponibilitat de CO₂ pot ser limitant en el creixement d'aquestes (Friedlander i Levy 1995).

1.3.1. La temperatura

L'efecte de la temperatura en el cultiu és molt important i cada espècie té el seu rang òptim. En l'espècie *Ulva pertusa* el creixement òptim és de $20 \pm 3,69$ °C, tal com va concloure Wang et al., (2007). Mata et al., (2015) va obtenir els resultats de la Figura 5 els quals ens indiquen el màxim creixement d'*Ulva ohnoi* es troba als 27°C i que a partir d'aquesta temperatura hi ha una disminució en el creixement.

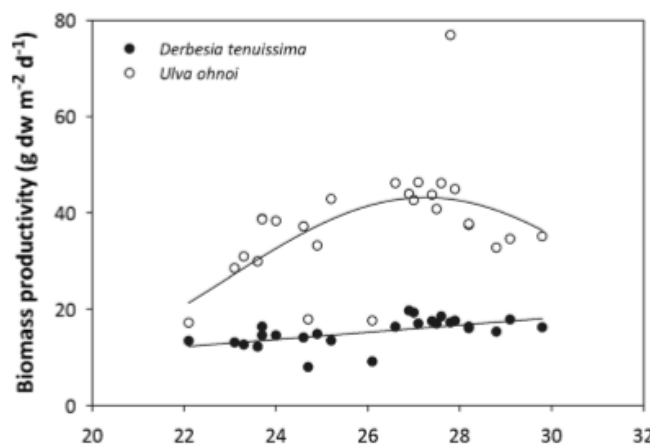


Figura 5. Producció de la biomassa d'*Ulva ohnoi* i *Derbesia tenuissima* enfront de la temperatura (Mata et al., 2015)

1.3.2. La densitat de cultiu

Quan les macroalgues es cultiven en tancs un factor important en el creixement és la densitat en què es cultiven, ja que aquesta fa que augmenti la competència per la llum i pels nutrients si són escassos. Neori i Msuya (2008) van determinar que la densitat de cultiu òptima en *Ulva lactuca* és d'1 Kg m⁻².

1.3.3. La irradiació

Cada espècie de macroalga té uns requisits mínims i màxims d'irradiació per al creixement. Però a la vegada aquests depenen de la manera de cultiu d'aquesta. En condicions de laboratori on la macroalga creix en una placa de petri la necessitat de llum és inferior, ja que no hi ha competència i la irradiació és constant. En aquestes condicions *Ulva sp.* Té el mínim per sota de $35 \mu\text{mol fotons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de radiació PAR i entre 35 i $80 \mu\text{mol fotons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ no hi ha restriccions de creixement (Duke, 1989). En canvi, quan es treballa en tancs la competència per la llum de les algues es fa més important a causa del “self-shading” o auto-ombreig i per tant se sol treballar amb unes irradiacions més elevades. Mata et al., (2015) va treballar en un rang de $150\text{-}370 \mu\text{mol fotons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Figura 6) i va observar que a més irradiació hi ha més creixement.

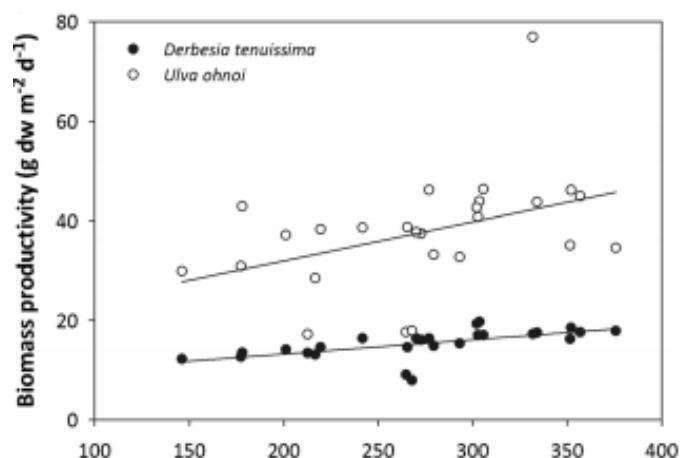


Figura 6. Producció de la biomassa de *Ulva ohnoi* i *Derbesia tenuissima* enfront de la irradiació en $\mu\text{mol fotons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Mata et al., 2015).

Londstaff et al., (2002) va observar que a partir de $1200 \mu\text{mol fotons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ s'inicia la fotoinhibició i fins i tot disminueix significativament la velocitat de la cadena de transport d'electrons en *Ulva lactuca*.

1.3.4. La salinitat

Algunes macroalgues es poden trobar en llocs més o menys estancats i per tant han de suportar uns canvis relativament alts en la salinitat durant un període de temps curt. Aquests canvis ràpids poden tenir efectes marcats sobre el creixement de macroalgues. Algunes espècies d'*Ulva* s'han adaptat a aquest tipus d'entorn i tenen una tolerància a la salinitat que va des de $3\text{-}115 \text{ g L}^{-1}$ (Lobban i Harrison, 1997).

D'altra banda, *Ulva* es veu afectada negativament per la baixa salinitat i en l'estudi realitzat per Murthy et al., (1988) s'observa una disminució del creixement d'*Ulva lactuca* a salinitats per sota dels 30 g L^{-1} i Friedlander (1992) també va trobar reducció en creixement *Ulva lactuca* a salinitats inferiors a 20 g L^{-1} . El màxim creixement en *Ulva ohnoi* es va observar amb una salinitat de 35 g L^{-1} (Angell et al., 2015).

1.3.5. Els nutrients; nitrogen i fòsfor

Els nutrients més estudiats i importants per al creixement de les macroalgues són nitrogen i el fòsfor els quals es troben en diverses formes.

L'amoni (NH_4^+) i el nitrat (NO_3^-) són les principals fonts de nitrogen de les macroalgues al seu hàbitat natural i s'utilitzen com aliment en els sistemes d'aqüicultura multitròfica integrada (Copertino et al., 2008). L'amoni, el qual pot ser tòxic per algunes espècies d'algues en concentracions superiors a 30-50 μM , és la forma preferida d'*Ulva* (Lobban i Harrison, 1994). El nitrogen forma part de les proteïnes i els nucleòtids de la biomassa.

El fòsfor a l'aigua marina es troba sobretot en forma de fosfat (PO_4^{3-}) el qual, igual que el nitrogen, és essencial en el creixement de les macroalgues i pot arribar a ser limitat en el mar a la primavera, ja que es troba en molt baixes concentracions. Aquest forma part de molts intermedis metabòlics, lípids, enzims i altres compostos bioquímics.

1.4. Aplicacions d'*Ulva*

El gènere *Ulva* està adaptat a un rang molt gran de condicions ambientals i té una alta capacitat d'extreure nutrients i contaminants (Bolton et al., 2009). Per tant pot ser integrat com a biofiltre d'aigües residuals, d'una manera eficient, en la bioremediació de nutrients dels sistemes de producció animal, ja siguin procedents d'indústries d'explotacions aquícoles o agrícoles (Cole et al., 2014). També cal destacar que el gènere *Ulva* té una gran quantitat d'aplicacions, des de la producció de bioenergia (Neveux et al., 2014) i carbó vegetal (Bird et al., 2011) fins a sucres i carbohidrats d'alt valor per l'ús nutricional i biomèdic. Per exemple el ulvan, que és un heteropolisacàrid sulfatat que es troba a la paret cel·lular d'*Ulva*, té moltes aplicacions industrials farmacèutiques com en la producció d'anticoagulants, antioxidants, antivirals i antitumorals (Cardoso et al., 2014).

1.5. Aqüicultura multitròfica integrada

La producció mundial provinent de l'aqüicultura està augmentant al voltant d'un 10% anualment superant l'agricultura, la ramaderia i la pesca. En termes generals, l'aqüicultura és el sector de producció d'aliments amb un creixement més accelerat. Actualment representa quasi el 50% dels productes pesquers destinats a l'alimentació (Soto, 2009).

A causa d'aquest fet l'abocament de nutrients i matèria orgànica s'ha multiplicat en els últims anys la qual cosa afavoreix els processos d'eutrofització ja que només el 10-30% de nitrogen que s'afegeix a les gàbies de peix com a aliment es recupera com

peixos collits, mentre que 10-40% de nitrogen s'allibera en partícules de matèria orgànica i la resta, que representa aproximadament el 50% s'excreta en formes dissoltes (Yokoyama i Ishihi, 2010).

Per tal de minimitzar l'impacte de la producció aquícola sorgeix l'aquicultura multitrofica integrada (Integrated Multitrophic Aquiculture, IMTA) la qual es basa en la integració del cultiu de diferents espècies, per tal de crear un sistema on el flux de nutrients excretat pels peixos sigui aprofitat per altres espècies d'interès comercial com les algues i que la matèria orgànica pugui ser aprofitada per organismes filtradors com els mol·luscs.

Ens podem trobar amb sistemes IMTA en instal·lacions dins del mar. Un bon exemple seria una gàbia de peixos al mar on una part de les partícules de matèria orgànica, és aprofitada pel creixement dels mol·luscs i part del nitrogen i fòsfor, excretat en forma dissolta com a amoni (NH_4^+) i fosfat (PO_4^{3+}), són utilitzats per les algues en el seu creixement. Aquest sistema minimitza l'impacte però la eficiència és baixa en l'eliminació de les partícules, nitrogen i fòsfor.

Un altre tipus són els sistema IMTA que es troben a terra. Aquestes poden ser instal·lacions “flow-throught”, en que l'aigua captada del mar passa una sola vegada per la instal·lació, primer pels tancs de peixos i després pels tancs d'algues per tal d'eliminar l'amoni. Això en el cas si el sistema és integrat amb algues. L'altre tipus d'instal·lacions són amb recirculació (RAS). En aquestes l'aigua és tractada i es reutilitza en el sistema. En aquest cas es treballa amb concentracions més altes de nitrogen i fòsfor. El nitrogen excretat en forma de NH_4^+ és tòxic a partir de 1 mg L^{-1} i per tal de poder suportar més nitrogen en el sistema es fa servir un filtre biològic on els microorganismes poden nitrificar el NH_4^+ fins NO_3^- en medi aeròbic amb la següent reacció:



Aquest fet ens permet arribar a concentracions de 50 mg L^{-1} de NO_3^- (Timmons i Ebeling, 2002), ja que no mostra efectes negatius fins aquest valor i per tant es pot tenir una carrega de nitrogen total molt més elevada en l'aigua. D'aquesta manera no es necessita abocar tanta aigua com a residu (Abreu et al., 2011), i a més es disminueixen els costos i la dependència de l'aigua i el sistema es fa més sostenible (Neori et al., 2004).

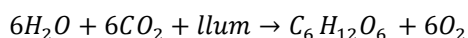
1.6. Característiques específiques d'un RAS integrat amb algues

La majoria de sistemes IMTA que associen peixos i algues cultivats en tancs treballen amb sistemes “flow-throught” en els que l'aigua captada del mar passa una sola vegada pel sistema, primer pels tancs de peixos i després pels d'algues aconseguint així reduir el vessament de nutrients al mar.

Però l'aqüicultura de peixos en tancs sembla anar evolucionant cap a sistemes de recirculació en els que l'aigua és recirculada i passa moltes vegades per la instal·lació. D'aquesta manera s'aconsegueix reduir el cabal d'aigua de renovat i el cabal vessat al mar, carregat de nutrients. Això facilita el control i tractament dels efluent i pot permetre allunyar la instal·lació de la línia de costa. Així es disposa de molta més superfícies per fer-hi instal·lacions aquícoles, ja que a la línia de costa aquestes són molt limitades.

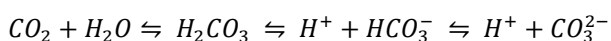
Les condicions dins d'un tanc de peixos en una instal·lació amb recirculació són molt diferents a les que trobem en un sistema "flow-through". Ens trobem amb concentracions molt més elevades de P, N, CO₂ i un pH més baix. El nitrogen el troben en forma de NO₃⁻, que és molt menys tòxic que el amoniacal el qual esta en concentracions molt baixes.

En el RAS (Recirculating Aquaculture System) on s'integren les algues és molt important el control de nitrogen i fòsfor, com s'ha dit anteriorment, perquè s'han de mantenir a uns nivell adequats per als peixos ja que poden arribar a ser tòxics. Les algues utilitzen aquests per al seu creixement i per tant n'eliminen una part. D'altra banda, els peixos consumeixen oxigen (O₂) al respirar i com a residu excreten diòxid de carboni (CO₂), el qual té molta importància en aquests sistemes. El CO₂ pot ser aprofitat per les algues ja que el necessiten per fer la fotosíntesi tal i com s'indica en la següent reacció:



A més el resultat d'aquesta és la producció d'O₂ que pot ser aprofitat per la respiració dels peixos. D'aquesta manera es pot reduir el consum d'oxigen a les instal·lacions i afavorir la disponibilitat de CO₂ per les algues.

Com s'ha esmentat abans, el diòxid de carboni juga un paper molt important en un sistema d'aqüicultura multitròfica integrada ja que els peixos l'excreten i les algues el poden aprofitar a la fotosíntesi. Però el pH esta estretament relacionat amb el CO₂ en l'equilibri de carboni inorgànic a l'aigua. Aquest equilibri químic és el que s'indica a continuació:



El pH desplaça l'equilibri cap a la formació de diòxid de carboni, bicarbonat o carbonat depenent del seu valor. A la Figura 7, observem l'abundància relativa de cada forma de carboni inorgànic depenent del pH.

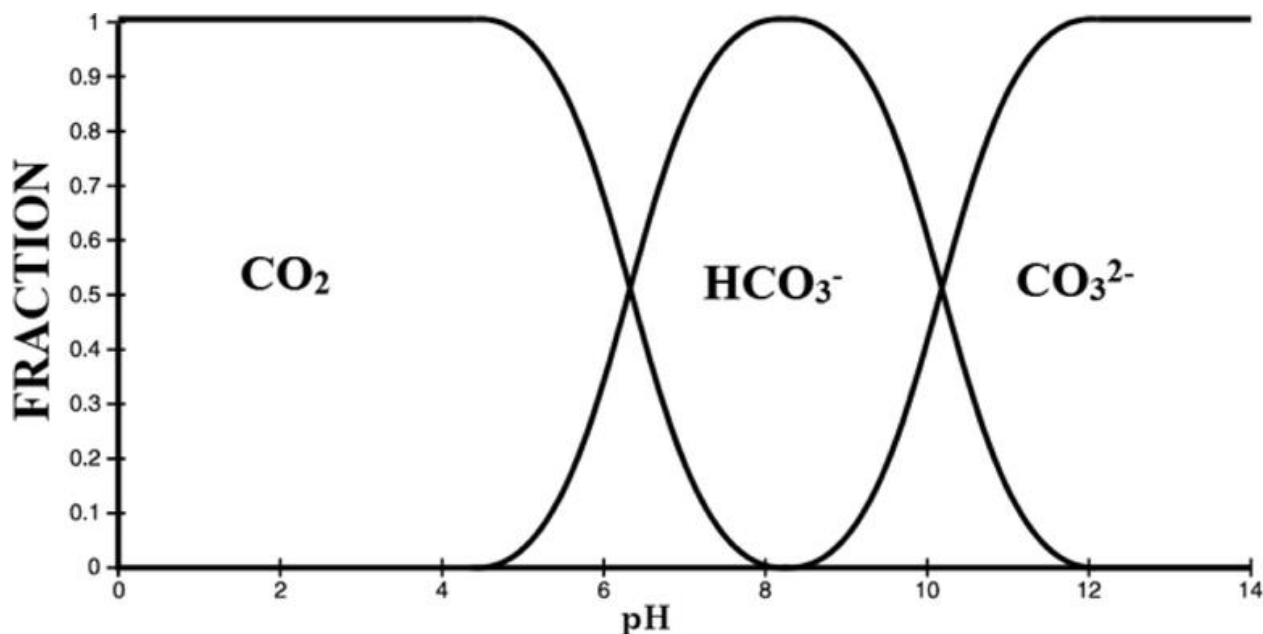


Figura 7. Abundància relativa de les formes de carboni inorgànic depenent del pH (Alabi et al., 2015).

Observem que a partir de pH 8 la quantitat de CO_2 és pràcticament nul·la i la forma que predomina és el bicarbonat (HCO_3^-). En la Taula 1 es mostren els valors exactes de les proporcions relatives del carboni inorgànic. És molt important la forma de carboni inorgànic que predomina en l'aigua, ja que la majoria de macroalgues utilitzen el CO_2 . També hi ha algunes que poden utilitzar el bicarbonat com a font de carboni, però això acostuma a reduir el seu rendiment en la fotosíntesi.

Taula 1. Proporció de cada forma de carboni inorgànic depenent del pH (Bain i Proctor, 1980).

pH	CO_2	HCO_3^-	CO_3^{2-}
4	0.996	0.004	1.25×10^{-9}
5	0.962	0.038	1.20×10^{-7}
6	0.725	0.275	9.1×10^{-5}
7	0.208	0.792	2.6×10^{-4}
8	0.025	0.972	3.2×10^{-3}
9	0.003	0.966	0.031
10	0.000	0.757	0.243

En resum, en un sistema d'aqüicultura amb recirculació integrat amb macroalgues és molt important el control de les instal·lacions per tal d'optimitzar el sistema. Les algues poden extreure els nutrients, com el nitrogen, fòsfor i el diòxid de carboni, excretats pels peixos i aprofitar-los per al seu creixement, mentre fan de filtre biològic de l'aigua. A la vegada els peixos poden aprofitar l'oxigen produït en la fotosíntesi de les macroalgues per la seva respiració.

1.7. Objectius

Per tal de contribuir a millorar l'eficiència de les instal·lacions de producció de macroalgues associades a sistemes de recirculació aquícola, en aquest treball ens plantegem els següents objectius:

- 1- La determinació de les taxes d'eliminació de nutrients en un cultiu de *Ulva ohnoi* associat a un sistema de recirculació aquícola.
- 2- La estimació de l'estalvi d'oxigen i diòxid de carboni en un sistema d'aqüicultura multitròfica integrada amb recirculació.

2. Material i mètodes

2.1. Instal·lació

La instal·lació es troba a l'interior de l'Escola Superior d'Agricultura de Barcelona en el campus baix Llobregat de la Universitat Politècnica de Catalunya. Aquesta consta de dos tancs amb peixos, tres tancs amb algues (R) que tenen els seus respectius focus, un tanc amb el filtre biològic, el qual és el centre de distribució d'aigua anomenat tanc d'expansió, i a més hi ha un dipòsit intermedi d'on es reparteix l'aigua als tres tancs R.

- **Tancs amb peixos:** Els dos tancs de peixos contenen llenguados (*Solea senegalensis*) i la massa total d'aquests és aproximadament de 25 Kg. Els tancs són cilíndrics amb aeració i un cabal d'entrada de 400 L h^{-1} , el diàmetre interior d'aquests és de 98,5 cm i l'alçada d'aigua de 28 cm.
- **Tancs R amb algues:** Tenen una superfície circular de $0,322 \text{ m}^2$ i una forma cilíndrica amb una capacitat de 90 L. Cada tanc té el seu respectiu focus. La part inferior dels tancs és lleugerament cònca i és on es troba l'entrada d'aire la qual crea el moviment de les macroalgues (*Ulva ohnoi*). La sortida té mig tub amb orificis a la paret interior per tal que pugui sortir l'aigua però no la macroalga del tanc. Des de l'interior del tub l'aigua surt per una conducció i puja fins un colze a l'alçada que marca el nivell d'aigua del tanc. Quan puja el nivell del tanc comença a vessar aigua pel colze i circula cap al tanc d'expansió.
- **Tanc d'expansió:** El tanc és cilíndric amb diàmetre interior de 80 cm i l'alçada d'aigua de 60 cm. Al seu interior conté el filtre biològic on els bacteris oxiden el NH_4^+ , procedent dels tancs dels peixos, a NO_3^- .
- **Dipòsit intermedi:** El dipòsit intermedi és el lloc d'on es reparteix l'aigua als tancs R i aquest la rep del tanc d'expansió. Té un sistema per tal de bloquejar l'entrada d'aigua quan aquesta arriba a una certa alçada. Aquest sistema consisteix amb una boia la qual en pujar el nivell d'aigua bloqueja l'entrada d'aquesta.

Una altra cosa que s'ha de tenir en compte és que la instal·lació conté una unitat de desinfecció amb llum ultraviolada per on circula l'aigua i així es controlen els patògens. També hi ha una unitat de control de temperatura de l'aigua dels tancs dels peixos per tal que es mantingui a 20°C . Això ens ajuda a fer que no hi hagin grans variacions de temperatura en els tancs d'algues estudiats ($19 \pm 2^\circ\text{C}$).

A més en la Figura 8 no s'aprecien les bombes peristàltiques que es feien servir per tal d'injectar cabals d'aigua inferiors a 8 L h^{-1} . Tots els cabals que van del dipòsit intermedi als tancs d'algues s'injecten amb aquestes bombes.

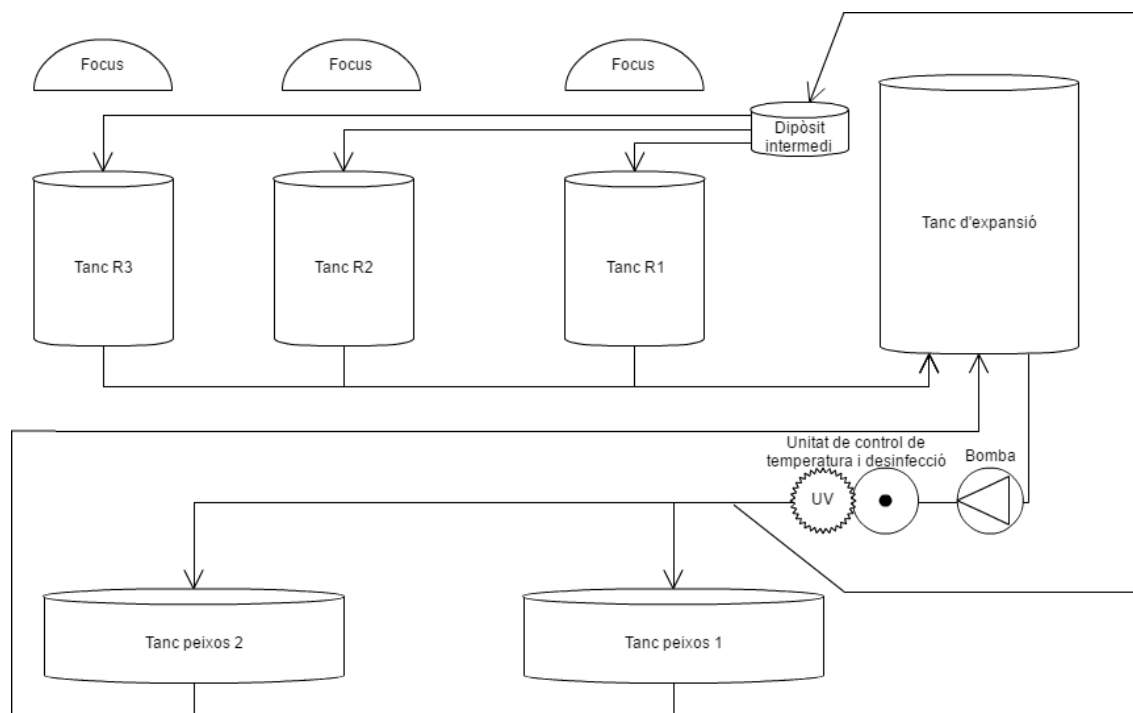


Figura 8. Esquema de la instal·lació on es van realitzar els diversos experiments.

La renovació de l'aigua en el sistema era mínima ja que no es disposava d'una presa directa d'aigua de mar, encara que hi havia dos dipòsits de 3000 L d'aigua marina en les instal·lacions tenia un cost molt elevat emplenar-los. D'aquesta manera es reduïen costos i s'acumulava el nitrogen i el fòsfor.

La biomassa utilitzada per a aquest projecte (*Ulva ohnoi*) era d'un projecte anterior, en el qual van obtenir les mostres dels tancs de decantació d'efluents en les instal·lacions de l'IRTA (Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentària) de Sant Carles de la Ràpita, Tarragona.

2.2. Disseny experimental

Per tal d'assolir els objectius del treball s'han realitzat diversos experiments. Per determinar les taxes d'eliminació de nutrients en un cultiu d'*Ulva ohnoi* (objectiu 1) es van realitzar els següents experiments:

- Comparació de dos procediments per l'obtenció de la taxa d'eliminació de nutrients: en un cas la renovació d'aigua en el tanc era puntual i es mesurava com evolucionava la concentració de nutrients en l'aigua en aquest. En l'altre hi havia l'entrada continua d'aigua i es feien balanços de matèria.
- Influència de la il·luminació en la taxa d'eliminació: es va comparar l'efecte de dues intensitats lumíniques en les taxes d'eliminació.

- Influència de la densitat de cultiu de les algues en la taxa d'eliminació de nutrients: es va comparar l'efecte de 3 densitats de cultiu en les taxes d'eliminació de nutrients.
- Influència de la taxa de renovació d'aigua en l'eliminació de nutrients i en el creixement: es va comparar l'efecte de 3 cabals d'entrada d'aigua diferents en les taxes d'eliminació de nutrients i el creixement.

Finalment, per estimar l'estalvi d'oxigen i diòxid de carboni (objectiu 2) es va realitzar el següent experiment:

- Monitoratge de l'oxigen dissolt i pH en un tanc d'algues i estimació de l'intercanvi d'oxigen i diòxid de carboni entre els tancs d'algues i peixos: es va monitorar l'oxigen dissolt i el pH de dos tancs amb diferent irradiació i es va mesurar la concentració de CO_2 en els tancs de peixos per tal d'estimar l'estalvi de O_2 i CO_2 .

Sempre que es canviaven les condicions d'un tanc aquest es mantenia una setmana sense analitzar, ja que necessitava un temps d'adaptació.

A continuació s'expliquen els experiments realitzats amb més detall.

2.2.1. Comparació de dos procediments per l'obtenció de la taxa d'eliminació de nutrients

En aquest experiment es van comparar 2 procediments per obtenir la taxa d'eliminació de nitrogen i fòsfor.

En el primer procediment s'emplenava un tanc R amb aigua procedent de peixos i es mesurava la concentració d'aquest al llarg del temps agafant mostres puntuals. L'aigua es renovava quan la concentració baixava per sota de 2 mg N L^{-1} aproximadament i es van realitzar 3 cicles.

En el segon procediment l'entrada d'aigua era constant amb un cabal de 2 L h^{-1} i es feien balanços de matèria per tal de calcular les taxes d'eliminació dels nutrients. Per això s'agafaven mostres puntuals d'aigua del tanc i de l'aigua que entrava en aquest, durant les 6 setmanes de l'experiment. Totes les mostres puntuals es recollien de dilluns a divendres, just abans que s'encenguin els focus. Aquestes s'agafaven per triplicat en cada punt per tal d'assegurar el valor. En el cas del tanc sense renovació s'agafaven mostres de l'aigua, per triplicat, aproximadament cada 3 dies perquè no seguia un balanç setmanal.

Els dos tancs analitzats es trobaven amb una irradiació de $163 \mu\text{mol m}^2 \text{ s}^{-1}$, una densitat de cultiu inicial de $0,8 \text{ Kg m}^{-2}$ i el fotoperíode era de 12 h de llum i 12 de fosc.

2.2.2. Influència de la il·luminació en la taxa d'eliminació

Per observar la influència de la il·luminació en la taxa d'eliminació de nutrients es van comparar dos tancs R. El primer rebia una irradiació de $163 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ i el segon $280 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. La densitat de cultiu inicial dels dos tancs era de $0,8 \text{ Kg m}^{-2}$, l'entrada d'aigua era de 4 L h^{-1} i el fotoperíode era de 12 h de llum i 12 h de foscor. A més, el tanc amb la irradiació més gran tenia una entrada d'àcid clorhídric de $0,12 \text{ mol d}^{-1}$ per augmentar la disponibilitat de CO_2 en l'aigua del tanc.

Es feien balanços de matèria per tal de calcular les taxes d'eliminació dels nutrients. Per això s'agafaven mostres puntuals d'aigua del tanc i de l'aigua que entrava en aquest. Totes les mostres puntuals es recollien de dilluns a divendres, just abans que s'encenguin els focus. Aquestes s'agafaven per triplicat en cada punt per tal d'assegurar el valor.

L'experiment amb el focus de $163 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ va durar 6 setmanes i 4 amb $280 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

2.2.4. Influència de la densitat de cultiu de les algues en la taxa d'eliminació de nutrients

Per observar la influència de la densitat de cultiu en les taxes d'eliminació es van comparar 3 tancs R amb densitats de cultiu inicials de $0,8 \text{ Kg m}^{-2}$, 1 Kg m^{-2} i $1,2 \text{ Kg m}^{-2}$. La irradiació en els 3 tancs R era de $280 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, l'entrada d'aigua de 4 L h^{-1} i el fotoperíode era de 12 h de llum i 12 h de foscor. A més, hi havia una entrada d'àcid clorhídric de $0,12 \text{ mol d}^{-1}$ per augmentar la disponibilitat de CO_2 en l'aigua dels tancs.

Es feien balanços de matèria per tal de calcular les taxes d'eliminació dels nutrients. Per això s'agafaven mostres puntuals d'aigua del tanc i de l'aigua que entrava en aquest. Totes les mostres puntuals es recollien de dilluns a divendres, just abans que s'encenguin els focus. Aquestes s'agafaven per triplicat en cada punt per tal d'assegurar el valor.

La duració de l'experiment va ser de 4 setmanes i per al càlcul de les diferències estadístiques s'ha fet servir l'anàlisi de variància ANOVA i la comparació múltiple amb el test Tukey d'un nivell de significació de 5% fent servir la plataforma InfoStat.

2.2.5. Influència de la taxa de renovació d'aigua en l'eliminació de nutrients i en el creixement

Per observar si la taxa d'entrada d'aigua influeix en l'eliminació de nutrients i en el creixement d'*Ulva ohnoi* es van comparar 3 tancs R amb cabals de 2 L h^{-1} , 4 L h^{-1} i 7 L h^{-1} els quals equivalen aproximadament a $1/4$, $1/2$ i 1 renovació de l'aigua del tanc al

dia. En aquest experiment la irradiació era de $163 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, la densitat de cultiu inicial de $0,8 \text{ Kg m}^{-2}$ i un fotoperíode de 12 h de llum i 12 de fosc.

Es feien balanços de matèria per tal de calcular les taxes d'eliminació dels nutrients. Per això s'agafaven mostres puntuals d'aigua del tanc i de l'aigua que entrava en aquest. Totes les mostres puntuals es recollien de dilluns a divendres, just abans que s'encenguin els focus. Aquestes s'agafaven per triplicat en cada punt per tal d'assegurar el valor.

La duració de l'experiment va ser de 6 setmanes i per al càlcul de les diferències estadístiques s'ha fet servir l'anàlisi de variància ANOVA i la comparació múltiple amb el test Tukey d'un nivell de significació de 5% fent servir la plataforma InfoStat.

2.2.6. Monitoratge de l'oxigen dissolt i pH en un tanc d'algues i estimació de l'intercanvi d'oxigen i diòxid de carboni entre els tancs d'algues i peixos

En aquest experiment es van monitorar dos tancs amb sondes d'oxigen dissolt i pH per tal d'observar l'evolució d'aquests al llarg del temps i calcular l'aportació d' O_2 als tancs de peixos. Un tanc rebia una irradiació de $163 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ i l'altre $280 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. La densitat de cultiu inicial dels tancs era de $0,8 \text{ Kg m}^{-2}$, l'entrada d'aigua de 4 L h^{-1} i el fotoperíode era de 12 h de llum i 12 h de fosc. A més, el tanc amb la irradiació més gran tenia una entrada d'àcid clorhídric de $0,12 \text{ mol d}^{-1}$ per augmentar la disponibilitat de CO_2 en l'aigua del tanc.

També es mesurava la concentració del CO_2 en l'aigua dels peixos per tal de poder calcular l'aportació d'aquest als tancs d'algues.

2.3. Mètodes analítics

2.3.1. Determinació del creixement fresc

Cada dilluns s'extreien les algues dels tancs per ser centrifugades, a aproximadament 600 rpm 3 vegades durant 15 s, i pesades per obtenir el pes fresc d'aquestes. Després es tornava al tanc la quantitat d'alga necessària per corregir la densitat establerta. D'aquesta manera podem saber el creixement durant la setmana.

2.3.2. Anàlisi d'aigua

S'analitzaven mostres d'aigua tal com s'ha indicat anteriorment. Per tal d'analitzar el nitrogen dissolt s'analitzava en NO_3^- , ja que al haver-hi el filtre biològic pràcticament tot el nitrogen estava en aquesta forma i enfront d'aquest el NH_4^+ és una part molt

petita. El fòsfor que s'analitzava també era forma dissolta, sobretot com fosfat. A més d'això, es mesurava la concentració de diòxid de carboni en l'aigua dels tancs de peixos. Tot seguit s'expliquen els mètodes utilitzats.

2.3.2.1. Anàlisi de N-NO_3^-

Per la determinació del contingut en nitrats en l'aigua utilitzem el mètode el *Ultraviolet Spectrophotometric Screening Method* (4500- NO_3^- B) descrit al Standard Methods (APHA, 1992) que és un mètode adequat per aigües amb baix contingut de matèria orgànica. Aquest mètode es basa en l'absorció de l'ió nitrat a l'ultravioleta, a 220nm. L'absorció de la matèria orgànica es compensa amb la lectura a 275nm.

La mostra es filtra per eliminar la interferència de partícules en suspensió i per tal de reduir l'error en la lectura que puguin causar els hidròxids i carbonats s'acidifiquen les mostres. La linealitat es manté fins a 11 mg $\text{N-NO}_3^- \text{ L}^{-1}$.

Material:

- Matrassos aforats de 50 mL.
- Pipetes de 1, 2, 5, 10, 20 i 25 mL.
- Pera de goma.
- Xeringa de 10-50mL amb Filtres de membrana amb un diàmetre de porus de 0,45 μm .
- Espectrofotòmetre.
- Aigua desionitzada.

Reactius:

- Solució mare de nitrats de 100 mg L^{-1} N-NO_3^- . Per prepara-la es pesen 0.7218 g de KNO_3 (assecat 1 h en estufa a 105°C) i es dissol en un litre d'aigua desionitzada.
- Solució intermèdia de 10 mg $\text{N-NO}_3^- \text{ L}^{-1}$. Per prepara-la es fa una dilució 1/10 de la solució mare. Es congela en vasos de 100 mL.
- Àcid clorhídric (HCl) 1M. Per preparar-lo mesurem 41,44 mL de HCl concentrat (37% i 1,19 g mL^{-1}) i diluïm fins a 500 mL amb aigua desionitzada.

Procediment:

Aquest mètode es pot dividir en quatre parts:

- Preparació dels patrons.

Per aconseguir una recta patró, a partir de la qual es determina la concentració de les mostres, necessitem preparar els set patrons de 0,2; 0,4; 0,8; 1; 2; 4 i 5 mg N-NO₃ L⁻¹. A partir de la solució intermèdia de 10 mg N-NO₃ L⁻¹ i aigua desionitzada es preparen els patrons. Es pipetegen 1, 2, 4, 5, 10, 20 i 25 mL de 10 mg N-NO₃ L⁻¹ en matrassos aforats de 50 mL i s'enrasa. Tot seguit afegim 1 mL de HCl 1M. Els patrons es poden guardar congelats en tubs d'assaig de 10 mL i descongelar per l'anàlisi.

- **Preparació de les mostres.**

Un cop recollides les mostres s'han de filtrar amb un filtre de membrana amb un diàmetre de porus de 0,45 µm. Depenent de la concentració esperada s'han de diluir les mostres perquè estiguin dins del rang de la recta patró, fins a 5ppm. En el nostre cas alguna mostra podria superar el rang i per tant sempre fem una dilució 1/5, és a dir 10 ml de mostra s'enrasen en un aforat de 50 mL amb aigua desionitzada. Tot seguit afegim 1mL de HCl 1M.

- **Lectura dels patrons i les mostres.**

Primer es mesura un blanc amb aigua desionitzada, a les dues cubetes, per tal d'ajustar el zero d'absorbància. Tot seguit es fan les lectures, per duplicat dels patrons i per triplicat les mostres, amb un espectrofotòmetre que ens permet llegir dues longituds d'ona (220 nm i 275 nm) a la vegada.

- **Càlculs.**

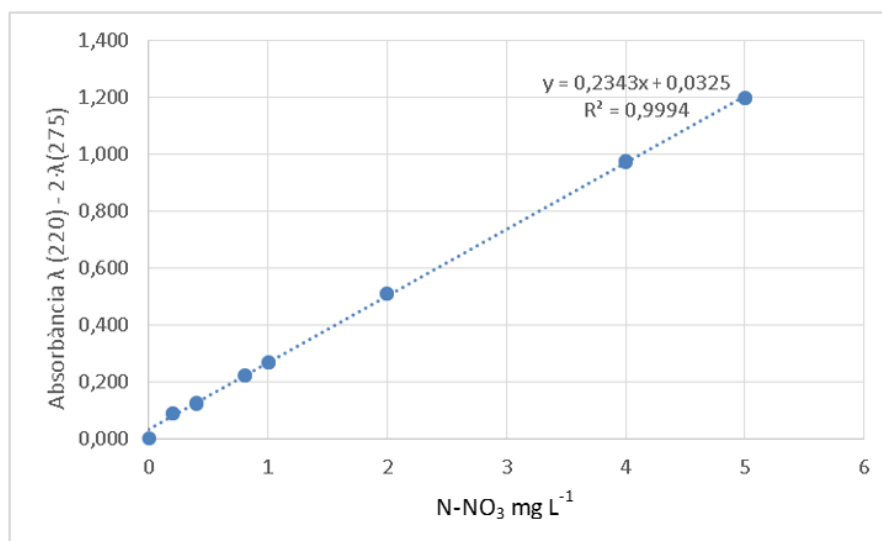
Un cop obtingudes les lectures de les mostres i els patrons (Taula 2), introduïm les dades a l'Excel. Primer apliquen el factor de correcció de la matèria orgànica, restant dues vegades la lectura de 275 nm al valor obtingut a la lectura de 220 nm tal i com s'indica a l'Equació 1. Els resultats s'observen a la Taula

$$\lambda N - NO_3 = \lambda(220) - 2 \cdot \lambda(275) \quad (eq.1)$$

Taula 2. Absorbància dels patrons de N-NO_3^- .

$\text{N-NO}_3^- [\text{mg L}^{-1}]$	$\lambda(220)$	$\lambda(275)$	$\lambda(220) - 2 \cdot \lambda(275)$
0	0,000	0,000	0,000
0,2	0,074	-0,007	0,088
0,2	0,073	-0,008	0,089
0,4	0,103	-0,010	0,123
0,4	0,103	-0,011	0,125
0,8	0,199	-0,011	0,221
0,8	0,200	-0,011	0,222
1	0,246	-0,012	0,270
1	0,246	-0,012	0,270
2	0,489	-0,010	0,509
2	0,490	-0,010	0,510
4	0,956	-0,009	0,974
4	0,957	-0,008	0,973
5	1,182	-0,007	1,196
5	1,183	-0,007	1,197

Tot seguit es dibuixa la recta patró (Figura 9) amb les lectures dels patrons i a partir d'aquesta, afegint la línia de tendència, obtenim l'equació de la recta i amb la regressió sabem si aquesta és vàlida. Finalment, amb l'equació de la recta, i multiplicant pel factor de dilució, obtenim les concentracions de N-NO_3^- en mg L^{-1} .


Figura 9. Exemple d'una recta patró de N-NO_3^- .

L'equació de la recta d'aquest exemple és la que es mostra tot seguit (Equació 2):

$$Y = 0,2343X + 0,0325 \quad (\text{eq. 2})$$

Aïllem la X (Equació 3) que és la concentració de N-NO₃⁻ en mg L⁻¹ :

$$X = \frac{(Y - 0,0325)}{0,2343} \quad (eq. 3)$$

Ara substituïm el valor de la Y i multipliquem per 5 (Equació 4) a causa de la dilució realitzada de la mostra. La Y és el valor que ens ha donat l'absorbància, havent aplicat la correcció de la matèria orgànica. Fem servir de exemple unes lectures del tanc R1 que es mostren a la Taula 3.

Taula 3. Exemple de les lectures del tanc R1.

Tanc	$\lambda(220) - 2 \cdot \lambda(275)$	N-NO ₃ [mg L ⁻¹]	Mitjana
R1	0,914	18,807	18,808
	0,912	18,773	
	0,916	18,843	

$$[N - NO_3] = \left(\frac{0,914 + 0,0325}{0,2343} \right) \cdot 5 = 18,807 \frac{\text{mg N} - \text{NO}_3}{\text{L}} \quad (eq. 4)$$

Per acabar, periòdicament s'han de fer comprovacions per tal de verificar el mètode. Per comprovar-ho es fa una lectura de aigua de mar neta, enrasant un matràs aforat de 50 mL i afegint-hi tot seguit 1 mL de HCl 1M, i una altra de testimoni que és una solució on s'afegeixen 5mL de solució intermèdia (10 mg N-NO₃ L⁻¹), s'enrasa amb aigua de mar a un matràs de 50 mL i s'afegeix 1 mL de HCl 1M.

Els valors de N-NO₃ oscil·len entre 0,7-0,9 mg L⁻¹ i per tant el testimoni ha de donar el mateix valor més una unitat, a causa de la solució intermèdia que se li ha afegit.

2.3.2.2. Anàlisi de P

Pràcticament tots els mètodes de determinació de P inorgànic es basen en la reacció dels ions amb molibdat acidificat per produir un heteropoliàcid fosfomolibdic el qual es redueix a un compost de color blau i per tant podem fer una colorimetria.

El mètode utilitzat per determinar la concentració de fòsfor dissolt en les mostres és el *Determination of Dissolved Inorganic Phosphate* descrit a *Methods of Seawater Analysis* (Grasshoff et al., 1999).

Material:

- Matrassos aforats de 50mL de coll llarg.
- Pipetes de 1, 2, 5 i 10 mL.
- Pera de goma.
- Filtres de membrana amb un diàmetre de porus de 0,45 µm.
- Espectrofotòmetre.
- Aigua desionitzada

Reactius:

- H_2SO_4 4,5M. Per preparar-lo mesurem 249,8 mL de H_2SO_4 concentrat (96% i $1,84 \text{ g mL}^{-1}$) i enrasem fins a 1L amb aigua destil·lada.
- Solució reductora: Per preparar la solució reductora afegim 5 g de àcid ascòrbic ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6$) en 25 mL d'aigua destil·lada i afegim 25 mL d'àcid sulfúric (H_2SO_4) 4,5 M. Aquesta solució es pot conservar a la nevera fins que agafi tonalitats groguenques (aproximadament 1 setmana).
- Cromogen: Per preparar-lo es dissolen 12,5 g de heptamolibdat d'amoni tetrahidratat ($(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) en 125 ml d'aigua destil·lada (solució 1) . A part dissolem 0,5 g de tartrat d'antimoni i potassi ($\text{K}(\text{SbO})\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_6$) en 20 ml d'aigua destil·lada (solució 2) . Finalment afegim primer la solució 1 i després la solució 2 a 350ml d'àcid sulfúric 4,5M agitant contínuament.
- Solució mare de 100 ppm P: Per preparar-la dissolem 0,439 g de KH_2PO_4 (assecat a l'estufa 1hora a 105°C) en 1 L d'aigua desionitzada. S'ha de conservar a la nevera.
- Solució intermèdia de 20 ppm P: Per preparar-la afegim 20 mL de solució mare i enrasem a 100 mL amb aigua desionitzada. S'ha de conservar a la nevera.

Procediment:

Aquest mètode es pot dividir en sis parts:

- **Preparació dels patrons.**
Per aconseguir una recta patró, a partir de la qual es determina la concentració de les mostres, necessitem preparar els patrons de 0,1; 0,2; 0,5 i 1 mg L^{-1} P i un blanc amb aigua desionitzada. Els preparem amb una solució de 5 ppm P la qual obtenim afegint 25 mL de la solució intermèdia en un matràs de 100 mL i enrasant amb aigua desionitzada. A partir d'aquesta i aigua desionitzada es preparen els patrons pipetejant 1, 2, 5 i 10 mL de la solució de 5 ppm en aforats de 50 mL i enrasant amb aigua desionitzada.
- **Preparació de les mostres.**
Un cop recollides les mostres s'han de filtrar amb un filtre de membrana amb un diàmetre de porus de $0,45 \mu\text{m}$ per tal de reduir al màxim l'error de les partícules en suspensió que puguin haver en les mostres al fer la lectura.
- **Lectura dels patrons i les mostres.**
En els matrassos aforats de 50 mL on tenim els patrons i les mostres, les quals no estan diluïdes, afegim 1 mL de solució reductora i agitem. A continuació afegim 1 mL de reactiu cromogen i tonem a agitar. Un cop fet això esperem 10 minuts. El blanc no ha de desenvolupar color i serveix per omplir les dues

cubetes de referència i ajustar el zero d'absorbància. Un cop fet això llegim primer per duplicat cada patró i tot seguit per triplicat cada mostra a 880 nm.

- **Càlculs.**

Un cop obtingudes les lectures dels patrons i les mostres, introduïm les dades a l'Excel, tal i com es mostra a la Taula 4.

Taula 4. Absorbància dels patrons de P.

P [mg L ⁻¹]	λ (880)
0	0
0,1	0,0731
0,1	0,0743
0,2	0,1464
0,2	0,1477
0,5	0,3666
0,5	0,3664
1	0,7304
1	0,7306

Tot seguit es dibuixa la recta patró (Figura 10) amb les lectures del blanc i dels patrons de 0,1; 0,2; 0,5 i 1 mg L⁻¹ P i a partir d'aquesta, afegint la línia de tendència, obtenim l'equació de la recta i amb la regressió sabem si aquesta és vàlida. Finalment, amb l'equació de la recta, obtenim les concentracions de P en mg L⁻¹.

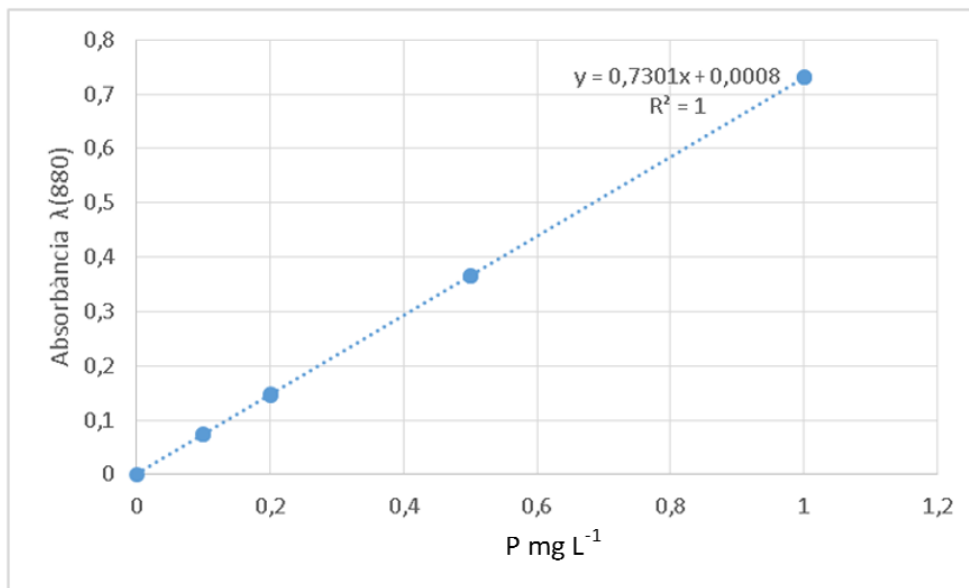


Figura 10. Exemple d'una recta de patrons de P.

L'equació de la recta d'aquest exemple és la que es mostra tot seguit (Equació 5):

$$Y = 0,7301X + 0,0008 \quad (eq. 5)$$

Aïllem la X (Equació 6) que és la concentració de fòsfor dissolt en mg L⁻¹:

$$X = \frac{(Y - 0,0008)}{0,7301} \quad (eq. 6)$$

Ara substituïm el valor de la Y, que és el valor que ens ha donat l'absorbància. Fem servir d'exemple unes lectures del tanc R1 que es mostren a la Taula 5.

Taula 5. Exemple de les lectures del tanc R1.

Tanc	λ (880)	P [mg L ⁻¹]	Mitjana
R1	0,208	0,284	0,286
	0,210	0,287	
	0,211	0,287	

Per acabar, periòdicament s'han de fer comprovacions per tal de verificar el mètode. Per comprovar-ho es fa una lectura d'aigua de mar neta, enrasant un matràs aforat de 50mL i una altra de testimoni que és una solució on s'afegeixen 2 mL de solució intermèdia (25 mg P L⁻¹), s'enrasa amb aigua de mar a un matràs de 50 mL. Els valors de P estan al voltant de 0,03 mg L⁻¹ i per tant el testimoni ha de donar el mateix valor més una unitat, a causa de la solució intermèdia que se li ha afegit.

2.3.2.3. Anàlisi de la concentració de diòxid de carboni

La concentració del diòxid de carboni es mesurava amb la sonda "OxyGuard CO2". El rang de mesura d'aquesta era de 0 a 50 mg L⁻¹ de CO2.

2.4. Càlculs realitzats

2.4.1 Creixement

El creixement de l'alga es calculava setmanalment a partir de l'Equació 7:

$$Creixement (g \cdot d^{-1}) = \frac{Pf - Pi}{t} \quad (eq. 7)$$

On: Pf és el pes final, Pi és pes inicial i t és el temps (7 dies).

Per obtenir el creixement per unitat de superfície necessitem dividir entre la superfície. El resultat es mostra a l'Equació 8:

$$Creixement (g \cdot d^{-1} \cdot m^{-2}) = \frac{Pf - Pi}{t \cdot S} \quad (eq. 8)$$

On: la S és la superfície.

2.4.2. Balanços de matèria

Els balanços de matèria s'han realitzat setmanalment amb l'equació 9, per calcular l'eliminació dels nutrients, tant per al N-NO_3^- com per al P.

$$\text{Eliminació (mg} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{d}^{-1}) = \frac{(C_{out\ i} - C_{out\ f}) \cdot V + \left(\frac{\sum C_{in}}{n} - \frac{\sum C_{out}}{n} \right) \cdot Q_{in} \cdot t_{in} \cdot \Delta t}{S \cdot \Delta t} \quad (\text{eq. 9})$$

On: $C_{out\ i}$ és la concentració de l'aigua del tanc inicial (dilluns), $C_{out\ f}$ és la concentració de l'aigua del tanc final (divendres), C_{out} és la concentració de l'aigua de sortida del tanc (diari), C_{in} és la concentració de l'aigua d'entrada al tanc (diari), V és el volum del tanc en litres, Q_{in} és el cabal d'entrada d'aigua al tanc, t_{in} és el temps que entra aigua al tanc, n és el nombre de mostres, S és la superfície del tanc i Δt és la variació de temps en dies.

3. Resultats i discussió

3.1. La determinació de les taxes d'eliminació de nutrients en un cultiu d'*Ulva ohnoi* associat a un sistema de recirculació aquícola

S'han comparat dos procediments per obtenir les taxes d'eliminació i també l'efecte de la irradiació, la densitat de cultiu i el cabal d'aigua d'entrada en l'eliminació de nutrients. Tot seguit es mostren els resultats de cada experiment.

3.1.1. Comparació de procediments per l'obtenció de la taxa d'eliminació de nutrients

3.1.1.1. Procediment 1: sense cabal continu d'entrada

Per tal de calcular les taxes d'eliminació de nitrogen i fòsfor un tanc es trobava sense cabal d'entrada d'aigua, amb una densitat de $0,8 \text{ Kg m}^{-2}$ i la irradiació que rebia el tanc era de $163 \mu\text{mol fotons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. Com que aquest tanc no tenia cabal d'entrada constant es mesurava la concentració de nutrients a l'aigua del tanc per obtenir l'evolució de N i P. Quan la concentració de N arribava a 2 mg L^{-1} , aproximadament, es buidava el tanc i es tornava a omplir amb aigua del tanc d'expansió. Les dades obtingudes es mostren a la Figura 11 i 12:

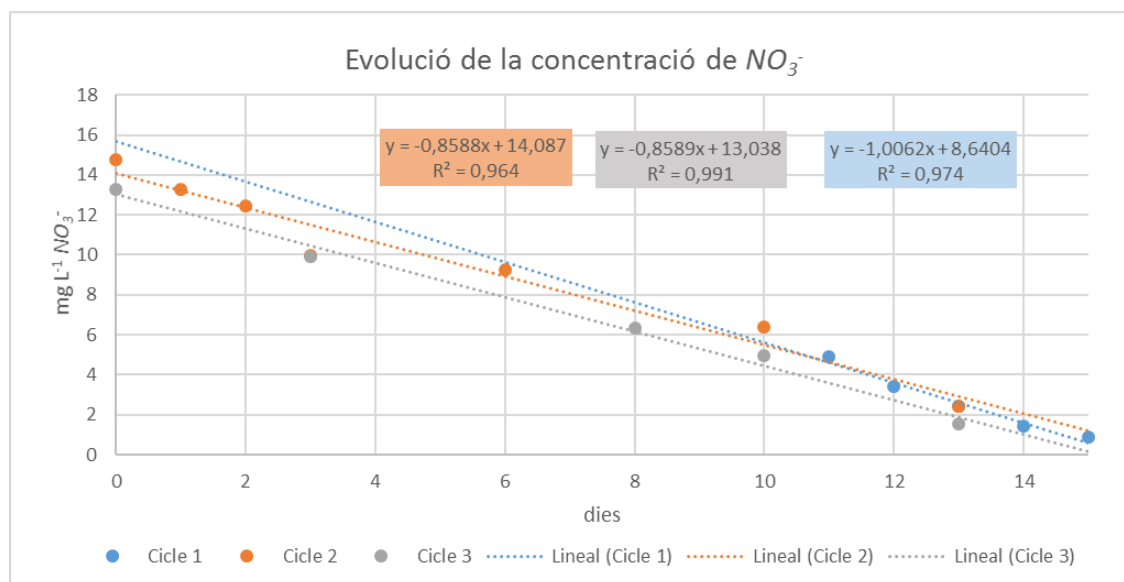


Figura 11. Evolució de la concentració de NO_3^- dels tres cicles i les equacions de les rectes en el tanc sense renovació d'aigua el qual es trobava amb una densitat de $0,8 \text{ Kg m}^{-2}$ i una irradiació de $163 \mu\text{mol fotons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$.

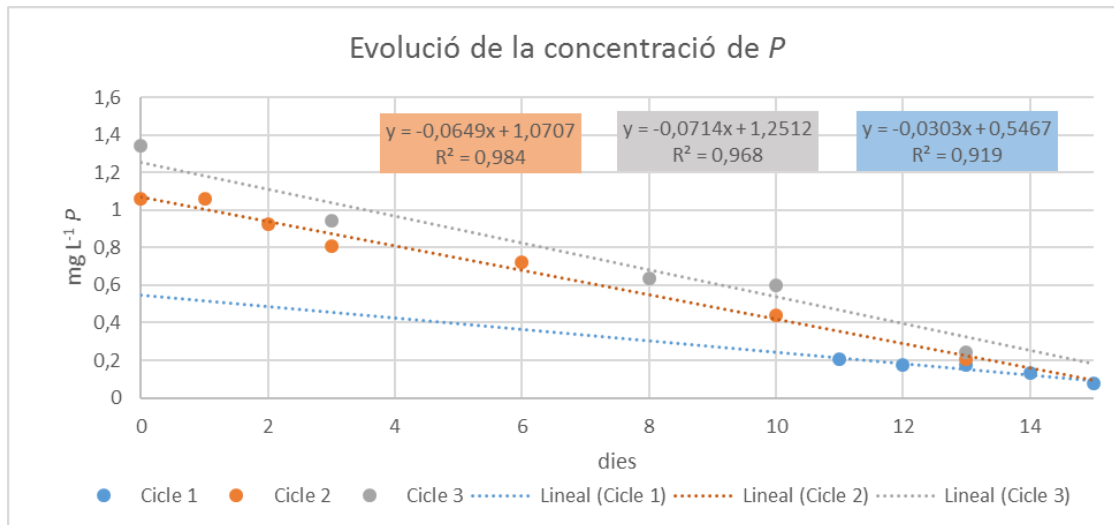


Figura 12. Evolució de la concentració de P dissolt dels tres cicles i les equacions de les rectes en el tanc sense renovació d'aigua el qual es trobava amb una densitat de $0,8 \text{ Kg m}^{-2}$ i una irradiació de $163 \mu\text{mol fotons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$.

El pendent obtingut ens indica l'eliminació de N i P i l' R^2 tan propera a 1 que l'eliminació és lineal, almenys en les concentracions que s'ha reballat. S'observa que el cicle 1, tant en el N com en el P té un pendent una mica diferent dels altres i també que les concentracions van ser molt més baixes que en els altres cicles, això és degut a que els nutrients es van afegir 11 dies abans de començar a analitzar l'aigua. Com que en les instal·lacions on s'han realitzat els experiments les concentracions d'aquests nutrients sempre són més altes, el N-NO_3^- el trobem entre 10 i 16 mg L^{-1} i el P dissolt entre 1 i $0,5 \text{ mg L}^{-1}$, no tindrem en compte el cicle 1 en el càlcul de les taxes d'eliminació de N i P.

L'eliminació de N-NO_3^- mitjana entre el cicle 2 i 3 és de $0,86 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ i de $0,068 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ de P. Transformem els resultats en unitats més practiques (Equació 10) i obtenim que l'eliminació de N-NO_3^- és:

$$\text{Eliminació} = \frac{0,86 \frac{\text{mg}}{\text{L} \cdot \text{d}} \cdot 90\text{L}}{0,322\text{m}^2} = 240 \frac{\text{mg N}}{\text{m}^2 \cdot \text{d}} \quad (\text{eq. 10})$$

En el cas de P (Equació 11) obtenim:

$$\text{Eliminació} = \frac{0,068 \frac{\text{mg}}{\text{L} \cdot \text{d}} \cdot 90\text{L}}{0,322\text{m}^2} = 19 \frac{\text{mg P}}{\text{m}^2 \cdot \text{d}} \quad (\text{eq. 11})$$

3.1.1.2. Procediment 2: amb cabal continu d'entrada

El segon tanc es trobava en les mateixes condicions que el primer, excepte que l'entrada d'aigua era constant amb un cabal de 2 L h^{-1} . Es van realitzar balanços de matèria per tal de calcular l'eliminació de N-NO_3^- i P dissolt. L'experiment va durar 6 setmanes però en una d'aquestes el dilluns es van trobar el tanc sense aeració. Això ens afecta a la dinàmica del moviment i fins i tot pot afectar a la quantitat de llum rebuda. Per això eliminem aquella setmana.

Els resultats obtinguts es mostren en la Taula 6:

Taula 6. Valors de l'eliminació obtinguda de N i P en el tanc amb entrada constant de nutrients amb un cabal de 2 L h^{-1} i la mitjana \pm desviació estàndard.

Setmana	Eliminació [$\text{g m}^{-2} \text{d}^{-1}$]	
	N-NO_3^-	P
Setmana 1	446,4	46,4
Setmana 2	259,4	30,9
Setmana 3	482,9	29,9
Setmana 4	340,0	23,7
Setmana 5	306,6	22,2
Mijana \pm DE	367 \pm 94	31 \pm 10

S'observa que hi ha una desviació important en l'eliminació tant de N-NO_3^- com de P dissolt i a més sembla que la taxa d'eliminació de P sigui inferior a cada setmana que passa. Per comprovar que l'entrada de nutrients era suficient agafem els valors mínims de N i P d'entrada ($10,72$ i $1,20 \text{ mg L}^{-1}$) i tenint en compte que el cabal d'entrada era de 2 L h^{-1} durant les 12 h de llum obtenim la Taula 7 i s'observa que l'entrada de nutrients duplica en els dos casos l'eliminació. Per tant no és del tot clar a què es deu la tendència a disminuir la taxa d'eliminació de P.

Taula 7. Eliminació de nutrients enfront l'entrada d'aquests en el tanc amb un cabal d'entrada de 2 L h^{-1} .

	Cabal d'entrada 2 L h^{-1}	
	Eliminació [$\text{mg m}^{-2} \text{d}^{-1}$]	Entrada [$\text{mg m}^{-2} \text{d}^{-1}$]
N-NO_3^-	367 \pm 94	799
P	31 \pm 10	89

Si comparem les dades dels dos tancs, un amb renovació i l'altre sense, obtenim els resultats que es mostren a la Taula 8. L'eliminació tant de nitrogen com de fòsfor és més gran en el tanc que rep una entrada d'aigua constant de 2 L h^{-1} . L'eliminació del nitrogen és un 53% més gran i del fòsfor un 63%. Aquestes diferències són bastant importants, però com s'ha esmentat anteriorment no hi ha limitació de nitrogen ni fòsfor en cap dels dos casos. Per tant les diferències han de ser a causa d'un altre factor.

Taula 8. Valors de les taxes d'eliminació d'un tanc sense cabal continu i l'altre amb.

	Eliminació [$\text{mg m}^{-2} \text{d}^{-1}$]	
	Amb cabal continu	Sense cabal continu
N- NO_3^-	367±94	240
P	31±10	19

Aquest factor segurament és el diòxid de carboni que arriba dels tancs de peixos els quals tenen una concentració de 12-20 ppm de CO_2 . En canvi als tancs d'algues es troben per sota d'1 ppm. Com que en un tanc tenim entrada continua d'aigua amb una concentració alta de CO_2 la disponibilitat d'aquest és més alta. En canvi en el tanc que té entrada puntual de nutrients l'únic CO_2 que hi ha és el de l'equilibri amb l'aire. Per tant la baixa disponibilitat de CO_2 en el tanc limita la taxa d'eliminació de N i P.

Un altre factor podria ser la terbolesa de l'aigua, ja que en el tanc que no té renovació l'aigua està més estancada. En canvi, a l'altre tanc es va renovant contínuament i això podria eliminar el fitoplàncton, els cianobacteris i espores de l'alga, entre altres, que puguin haver-hi a l'aigua. Però no s'han observat diferències a simple vista entre els dos tancs per tant atribuïm la diferència al diòxid de carboni.

A partir d'aquest experiment hem observat que s'elimina més nitrogen i fòsfor si l'entrada d'aigua és constant i a causa d'això tots els experiments següents tenen una entrada de nutrients continua.

3.1.2 Influència de la il·luminació en la taxa d'eliminació

Continuant amb les taxes d'eliminació es comparen dos tancs que tenien una densitat de cultiu inicial de $0,8 \text{ Kg m}^{-2}$, un cabal d'entrada d'aigua de 4 L h^{-1} i el mateix fotoperíode. La diferència és que un tanc es trobava amb un focus de 100 W ($163 \mu\text{mol fotons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) i l'altre amb un de 200 W ($280 \mu\text{mol fotons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) i a més en el tanc amb 200 W s'injectava $0,12 \text{ mol d}^{-1}$ d'àcid clorhídric per tal per millorar la disponibilitat de CO_2 . El tanc amb 163 PPFD (Photosynthetic Photon Flux Density) es va estudiar durant 6 setmanes però en una d'aquestes el dilluns es van trobar el tanc sense aeració i el divendres es troba el tanc amb la sortida obturada i a causa d'això puja el nivell del tanc fins vessar. Això ens afecta a la concentració de nutrients de l'aigua, la dinàmica del moviment i fins i tot a la quantitat d'irradiació rebuda a causa d'estar uns 10 cm més a prop del focus. Per això eliminem la setmana. El tanc amb 280 PPFD es va estudiar durant 4 setmanes. Els resultats obtinguts es mostren en la Taula 9:

Taula 9. Valors obtinguts de les taxes d'eliminació de N i P amb 163 i 280 PPFD i la mitjana \pm desviació estàndard.

Setmana	Eliminació [$\text{mg m}^{-2} \text{d}^{-1}$]			
	163 PPFD		280 PPFD	
	N	P	N	P
Setmana 1	450,6	35,4	522,1	41,2
Setmana 2	175,2	30,9	578,8	68,8
Setmana 3	390,5	27,2	598,7	47,3
Setmana 4	332,2	29,4	632,8	66,9
Setmana 5	702,3	26,3		
Mitjana \pm DE	410,2 \pm 192,2	29,8 \pm 3,6	583,1 \pm 46,4	56,1 \pm 13,9

En aquesta comparació varia més d'un factor, la intensitat lumínica i l'addició de l'àcid, per tant no podem saber quin dels dos factors afecta més a la taxa d'eliminació. Tal com s'ha indicat anteriorment en la Figura 6, en el rang d'intensitats lumíniques treballades en com més intensitat més creixement d'*Ulva ohnoi* i més eliminació de nutrients. Tanmateix a 280 $\mu\text{mol fotons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ hi ha pràcticament el doble d'eliminació de N i P que a 163 $\mu\text{mol fotons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ i no podem afirmar que això sigui degut únicament al flux de fotons fotosintètics perquè tal com s'ha observat anteriorment la disponibilitat de CO_2 en el tanc té influència en les taxes d'eliminació. Com que s'afegeix àcid en el tanc amb més il·luminació la disponibilitat d'aquest és més gran i per tant aquest té efecte en les taxes d'eliminació.

La desviació estàndard és molt gran en l'eliminació a 163 $\mu\text{mol fotons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ a causa de la ultima setmana de l'experiment, però no es va observar cap anomalia ni proliferació de fitoplàncton o cianobacteris. És possible que l'alga hagi estat a punt d'esporejar però en acabar l'experiment no es va observar el fenomen. En la bibliografia s'ha observat que és un fet bastant comú la gran dispersió en els valors de les taxes d'eliminació (Sun et al., 2015).

3.1.3. Influència de la densitat de cultiu de les algues en la taxa d'eliminació de nutrients i el creixement

Per tal d'observar la influència de la densitat de cultiu en les taxes d'eliminació hem comparat tres tancs amb diferents densitats de cultiu els quals es trobaven a 0,8 Kg m^{-2} , 1 Kg m^{-2} i 1,2 Kg m^{-2} , una irradiació de 280 PPFD i un fotoperíode idèntic de 12 h de llum i 12 de fosc. A més s'injectava 0,12 mol d^{-1} d'àcid clorhídric per augmentar la disponibilitat de CO_2 en l'aigua dels tancs. Els resultats obtinguts són els que es mostren a la Taula 10:

Taula 10. Eliminació de N i P en els tres tancs amb densitats de cultiu de 0,8, 1 i 1,2 Kg m⁻² i la mitjana \pm desviació estàndard.

Setmana	Eliminació NO ₃ ⁻ [mg m ⁻² d ⁻¹]			Eliminació P [mg m ⁻² d ⁻¹]		
	0,8 Kg m ⁻²	1 Kg m ⁻²	1,2 Kg m ⁻²	0,8 Kg m ⁻²	1 Kg m ⁻²	1,2 Kg m ⁻²
Setmana 1	522	631	661	41	47	57
Setmana 2	579	660	669	69	67	65
Setmana 3	599	651	712	47	56	53
Setmana 4	633	702	703	67	62	56
Mitjana \pm DE	583 \pm 46	660 \pm 30	686 \pm 25	56 \pm 14	58 \pm 9	58 \pm 5

Si representem valors de nitrogen, com s'observa a la Figura 13, veiem que a més densitat de cultiu hi ha més eliminació i això es repeteix durant cada setmana de l'experiment, encara que en algunes hi ha més diferències que en altres, però la tendència sempre és clara.

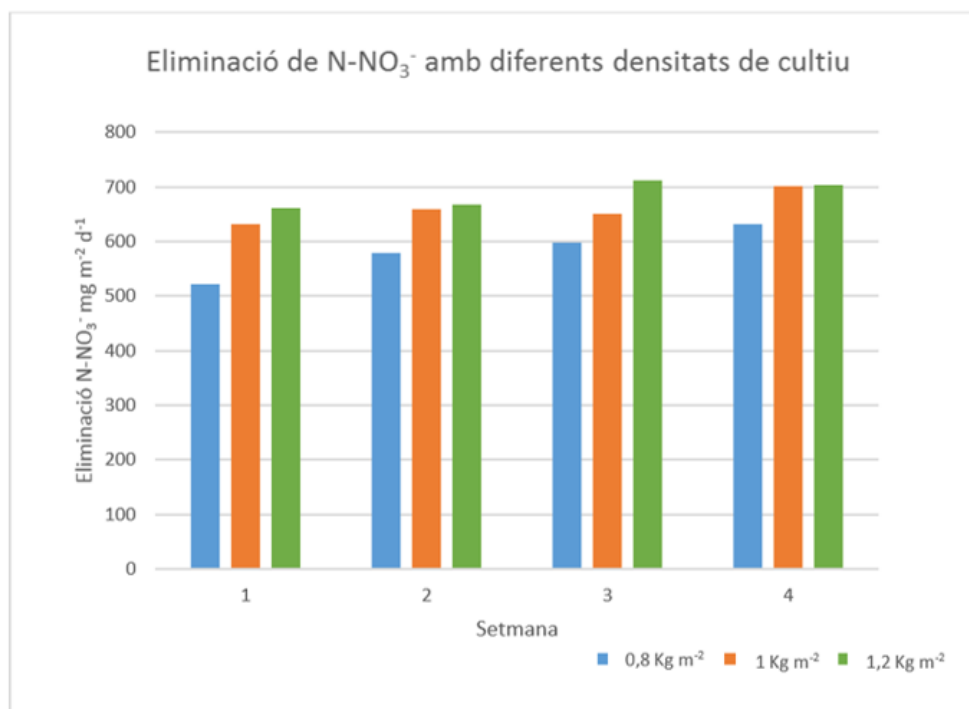


Figura 13. Taxes d'eliminació de N-NO₃⁻ amb densitats de cultiu de 0,8, 1 i 1,2 g m⁻² d⁻¹.

En fer l'anàlisi estadístic d'aquests valors s'observa que hi ha diferències significatives entre les eliminacions dels tres tancs fent l'anàlisi de variància ANOVA amb significació del 5%. El test de Tukey ens indica, tal com es mostra a la Figura 14, que hi ha diferències significatives entre els tancs de 0,8 i 1 Kg m⁻² i 0,8 i 1,2 Kg m⁻², però no podem afirmar-ho entre el 1 i 1,2 Kg m⁻².

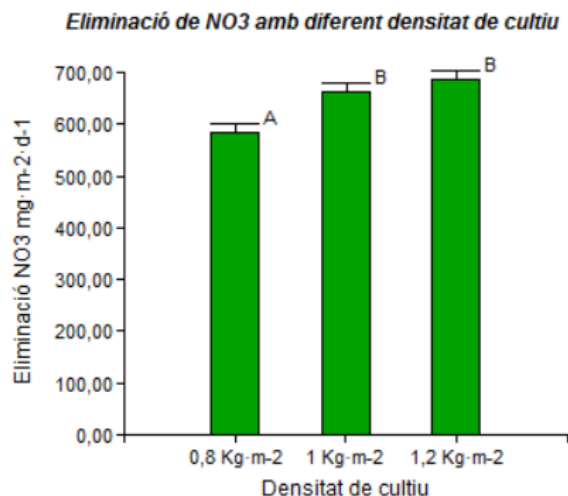


Figura 14. Resultats del test de Tukey comparant els creixements dels tancs amb 0,8 Kg m⁻², 1 Kg m⁻² i 1,2 Kg m⁻².

En canvi l'eliminació de P no presenta diferències sinó, és molt constant en els 3 tancs però la desviació estàndard es fa menor en com més gran la densitat de cultiu. Els creixements tampoc segueixen una tendència clara en funció de la densitat tal com es mostra en la Taula 11.

Taula 11. Creixements dels tres tancs amb diferent densitat de cultiu 0,8, 1 i 1,2 g m⁻² d⁻¹ i la mitjana ± desviació estàndard.

Setmana	Creixement [g m ⁻² d ⁻¹]		
	0,8 Kg m ⁻²	1 Kg m ⁻²	1,2 Kg m ⁻²
Setmana 1	121,4	101,7	76,6
Setmana 2	117,1	115,4	171,8
Setmana 3	120,6	90,0	104,0
Setmana 4	104,9	103,8	125,6
Mitjana±DE	116±8	103±10	119±40

En els resultats obtinguts només s'observen diferències significatives en les taxes d'eliminació de N, en com més gran la densitat més eliminació de nitrogen. La causa possiblement és que a més densitat de cultiu hi ha més "self-shading" o auto-ombreig i sembla que l'alga tendeix a acumular més nitrogen i a més s'observa una color més intens a més densitat de cultiu. Però aquesta petita variació de densitat, molt propera al rang òptim de creixement, no mostra diferències en l'eliminació de P i en el creixement. Això deu ser perquè a finals de la setmana les diferències de densitat disminueixen a causa de l'augment de la biomassa de les algues amb una taxa de creixement amb molt semblant entre els tancs.

La quantitat mitjana de nitrogen i fòsfor assimilat a les algues durant l'experiment va ser de 439,1±94,9 i 36,6±9,2 mg m⁻² d⁻¹ respectivament (Ferrer, 2016). En canvi les taxes d'eliminació de N i P van ser de 643,4±55,6 i 57,3±9,0 mg m⁻² d⁻¹ respectivament. Si fem la relació entre el nitrogen assimilat per l'alga i l'eliminat en el sistema obtenim que és de 0,69±0,16 en el cas del nitrogen i 0,66±0,22 per al

fòsfor. Això ens indica que aproximadament només el 68% de la eliminació de nitrogen i fòsfor és degut a la biomassa d'*Ulva ohnoi*. És possible que la resta de nutrients fos eliminada pel “fouling” o biomassa que creix a les parets dels tancs, els microorganismes que puguin créixer en el tanc com el fitoplàncton o cianobacteris o que surtin partícules molt petites de biomassa per la sortida del tanc o espores de l'alga.

3.1.4. Influència de la taxa de renovació d'aigua en l'eliminació de nutrients i en el creixement

En aquest cas comparem 2 tancs amb diferents cabals d'entrada de nutrients sense àcid, un amb 4 L h^{-1} i l'altre amb 2 L h^{-1} . La resta de variables es mantenen iguals per als dos tancs, una densitat de cultiu inicial de $0,8 \text{ Kg m}^{-2}$, una irradiació de 163 PPFD i un fotoperíode de 12 h de llum i 12 h de fosc. Es va mesurar el creixement fresc setmanal obtingut durant 6 setmanes de l'experiment. Una de les setmanes es va eliminar perquè que el dilluns d'aquesta setmana es van trobar els tancs sense aeració i el divendres es va trobar el tanc que tenia la sortida obturada i a causa d'això va pujar el nivell del tanc fins vessar. Això ens afecta a la concentració de nutrients de l'aigua, la dinàmica del moviment i fins i tot a la quantitat de llum rebuda a causa d'estar uns 10 cm més a prop del focus.

Compararem el creixement d'aquests dos tancs i un tercer que es va realitzar en les mateixes instal·lacions i tenia les mateixes condicions excepte que el cabal d'entrada era de 7 L h^{-1} (Oca et al., 2016). Els creixements obtinguts es mostren a la Taula 12:

Taula 12. Valors dels creixements en $\text{g m}^{-2} \text{ d}^{-1}$ de l'experiment amb cabals de 7, 4 i 2 L h^{-1} i la mitjana \pm desviació estàndard.

Setmana	Creixement [$\text{g m}^{-2} \text{ d}^{-1}$]		
	7 L h^{-1}	4 L h^{-1}	2 L h^{-1}
Setmana 1	73,1	67,7	23,9
Setmana 2	90,0	46,6	37,0
Setmana 3	73,3	87,1	80,0
Setmana 4	67,9	43,6	25,7
Setmana 5	71,6	88,9	49,5
Mitjana \pm DE	75,2 \pm 8,6	66,8 \pm 21,5	43,2 \pm 23,0

Amb aquests valors es fa la comparació estadística ANOVA per tal de saber si hi ha diferències significatives o no en el creixement entre els tres tancs i s'observa que aquestes són significatives. El test de Tukey (Figura 15) indica que entre els tancs amb 2 i 7 L h^{-1} hi ha diferències significatives però entre 2 i 4 L h^{-1} i entre 4 i 7 L h^{-1} no podem afirmar-ho.

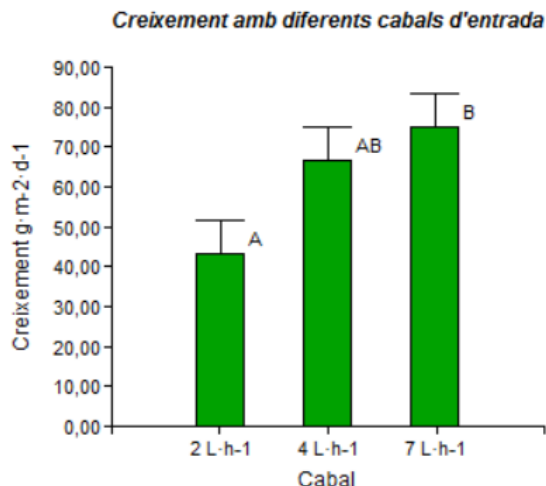


Figura 15. Resultats del test de Tukey comparant els creixements amb els 3 cabals d'entrada diferents.

Les taxes d'eliminació obtingudes en els tancs amb un cabal d'entrada de 2 i 4 L h⁻¹ es mostren a la Taula 13, no es disposa de les dades del tanc amb un cabal de 7 L h⁻¹. Si es comparen les eliminacions no hi ha diferències significatives entre aquests. Més bé, l'eliminació tant de nitrogen com del fòsfor són pràcticament iguals amb el cabal de 2 L h⁻¹ i de 4 L h⁻¹, encara que hi ha molta desviació entre les setmanes sobretot en el cas de nitrogen.

Taula 13. Taxes d'eliminació de nitrogen i fòsfor en els tancs amb un cabal d'entrada de 2 i 4 L h⁻¹ i la mitjana ± desviació estàndard.

Setmana	Eliminació [g m ⁻² d ⁻¹]			
	2 L h ⁻¹		4 L h ⁻¹	
	N-NO ₃ ⁻	P	N-NO ₃ ⁻	P
Setmana 1	446,4	46,4	450,6	35,4
Setmana 2	259,4	30,9	175,2	30,9
Setmana 3	482,9	29,9	390,5	27,2
Setmana 4	340,0	23,7	332,2	29,4
Setmana 5	306,6	22,2	702,3	26,3
Mijana±DE	367±94	31±10	410±193	30±4

Tal com s'ha observat anteriorment, a l'experiment de la comparació de procediments per l'obtenció de les taxes d'eliminació, l'entrada de N i P és més del doble eliminat en el cas del cabal de 2 L h⁻¹. Per tant no pot ser limitant en l'eliminació o el creixement. En aquest cas les diferències en el creixement de la macroalga deuen ser limitades per un altre factor i com que l'únic que varia entre els tancs és el cabal d'entrada d'aigua podem dir que la causa és al carboni inorgànic. Aquest arriba amb una concentració elevada des dels tancs de peixos fins al tanc d'expansió i des d'allí fins als tancs d'algues. En com més gran el cabal d'entrada al tanc més CO₂ arriba al tanc amb algues.

Com que les algues consumeixen el CO_2 mentre fan la fotosíntesi i desplacen l'equilibri cap al bicarbonat es veuen molt limitades pel diòxid de carboni. Per tant com que en el tanc amb 4 L h^{-1} arriba el doble de cabal d'aigua amb una concentració elevada de CO_2 la fotosíntesi es veu menys limitada i el creixement és més elevat.

En les taxes d'eliminació no hi ha diferències ni en el nitrogen ni el fòsfor però s'observa una desviació molt gran en els valors. Això fa pensar que les mostres d'aigua utilitzades per fer el càlcul de la taxa d'eliminació podrien haver estat alterades per l'agitació involuntària de l'aigua del tanc d'expansió i que això hagués provocat la resuspensió de sediments dipositats al fons.

3.1.5. Monitoratge d'un tanc amb *Ulva ohnoi*

Un d'algues ha estat monitorat amb dues sondes, una de pH i l'altra d'oxigen dissolt. Primer aquest tanc es trobava amb una densitat de cultiu de $0,8 \text{ Kg m}^{-2}$, una intensitat lumínica de $163 \mu\text{mol fotons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ i un cabal d'entrada d'aigua de 4 L h^{-1} . Després les condicions van canviar a una intensitat lumínica de $280 \mu\text{mol fotons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. La densitat de cultiu es va mantenir igual i l'entrada d'aigua també, encara que s'afegia $0,12 \text{ mol d}^{-1}$ de HCl per tal d'augmentar la disponibilitat de CO_2 . En les Figures 17 i 18 es mostra l'evolució dels tancs durant un període de temps en els dos casos.

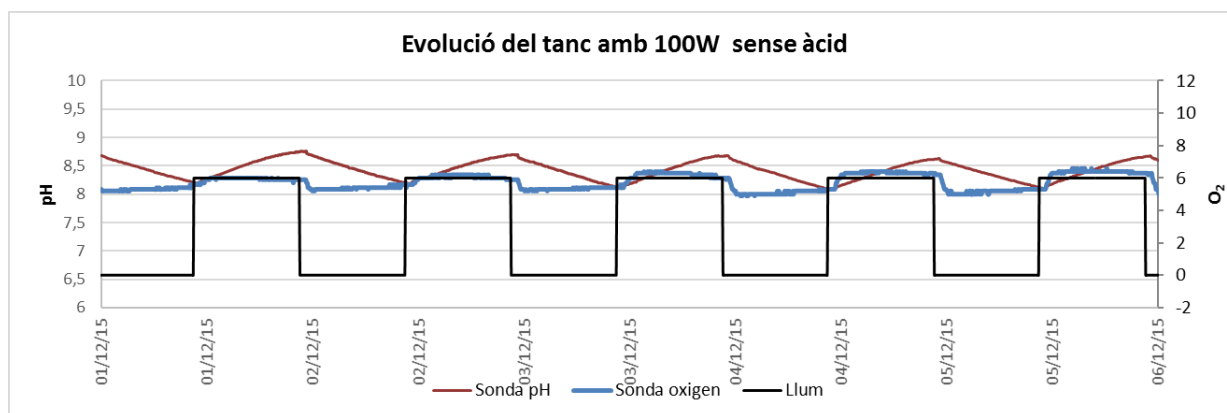


Figura 17. Evolució de l'oxigen i el pH del tanc R amb un focus de 100 W i una entrada de 4 L h^{-1} de nutrients. La línia vermella indica el pH, la blava l'oxigen dissolt en ppm i la negra si el focus està encès o no.

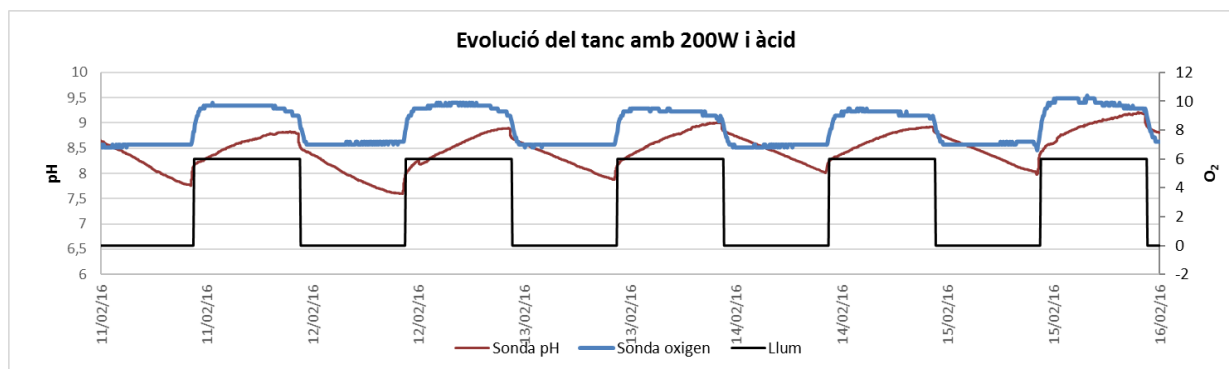


Figura 18. Evolució de l'oxigen i el pH del tanc R amb un focus de 200 W i una entrada de 4 L h⁻¹ d'aigua i de 0,12 mol d⁻¹ d'HCl. La línia vermella indica el pH, la blava l'oxigen dissolt en ppm i la negra si el focus està encès o no.

Hi ha una clara periodicitat en el pH. Quan s'encenen els focus aquest està en el seu valor mínim i en apagar-se al seu màxim. També s'observa que just en el moment que s'apaguen els llums la caiguda de pH és més brusca.

L'oxigen dissolt es manté molt constant durat tota la nit i quan s'encenen els focus puja ràpidament i es manté constant fins que aquests s'apaguen, encara que decreix lleugerament a partir de la meitat del període diürn. En apagar-se els focus l'oxigen torna a baixar fins al valor inicial.

S'observa que l'oscil·lació de pH és entre 8,1 i 8,7 en el tanc amb 100 W (163 PPFD) en canvi en el tanc amb 200 W (280 PPFD) oscil·la entre 7,8 i 9 aproximadament. Si ens fixem en l'oxigen la variació entre període diürn i nocturn és aproximadament de 0,5 unitats en el cas de 100 W i de 3,5-4 a 200 W.

Tots aquests valors ens indiquen que a 100 W hi ha menys activitat de la macroalga, sobretot per la quantitat d'oxigen que varia molt poc però també el pH varia menys que a 200 W. Això es deu sobretot a la llum que rep l'alga però encara així s'ha observat que l'oxigen comença a créixer a partir de la meitat del fotoperíode diürn. Aquest fet ocorre perquè la disponibilitat de CO₂ és tan baixa que la fotosíntesi comença a estar limitada, fins a tal punt que surt més oxigen, per la sortida d'aigua del tanc i per l'equilibri entre l'aigua i l'aire, del que es forma.

En tanc amb 200 W la variació d'oxigen i pH dia-nit és molt més gran i a més s'observa amb més claredat que la quantitat d'oxigen comença a disminuir a mitjan període diürn. En aquest cas que hi ha entrada d'HCl per tal d'augmentar la disponibilitat de CO₂ però no és suficient per evitar la limitació no obstant si per augmentar la producció d'oxigen, encara que també el focus té influència.

Com que el tanc d'algues amb 200 W té una concentració aproximada de 9,5 ppm d'O₂ durant el dia i els tancs de peixos es troben a 5 ppm. A més el cabal d'aigua dels tancs que surt és igual al que entra, és a dir 4 L h⁻¹ durant les 12 h de llum, podem calcular l'aportació d'oxigen per part de les algues al sistema (Equació 12).

$$O_2 \text{ aportat} = (9,5 - 5) \frac{mg \ O_2}{L} \cdot \frac{1g}{1000 \ mg} \cdot \frac{4L}{1h} \cdot \frac{12h}{d} \cdot \frac{1}{0,322 \ m^2} = 0,67 \frac{g \ O_2}{d \cdot m^2} \quad (eq.12)$$

A més s'ha mesurat la concentració de CO₂ en els tancs de peixos i oscil·la entre 12-20 ppm i el CO₂ té una concentració inferior a 1 ppm perquè és consumit en la fotosíntesi. Per estimar l'aportació de CO₂ agafem el valor mitjà de CO₂ d'oxigen i depreciam la quantitat que hi ha en els tancs d'algues durant les 12 h de llum (Equació 13).

$$CO_2 \text{ aportat} = 16 \frac{g \ CO_2}{L} \cdot \frac{1g}{1000 \ mg} \cdot \frac{4L}{1h} \cdot \frac{12h}{d} \cdot \frac{1}{0,322 \ m^2} = 2,39 \frac{g \ CO_2}{d \cdot m^2} \quad (eq.13)$$

4. Conclusions

En aquest treball s'ha analitzat l'efecte de les condicions de cultiu d'*Ulva ohnoi* en les taxes d'eliminació de N i P. Primer comparant si hi ha diferències depenent de si el flux d'entrada d'aigua al tanc era continu o no i després l'efecte de la quantitat d'irradiació, de la densitat de cultiu i de diferents taxes de renovació d'aigua. Finalment, es monitoren dos tancs d'algues per observar l'evolució de l'oxigen dissolt i pH en el cicle dia-nit i calcular l'O₂ aportat per les algues i el CO₂ pels peixos.

La disponibilitat de CO₂ als tancs d'algues sembla tenir un paper fonamental en les taxes d'eliminació de nutrients i en el creixement. Això es posa de manifest en diferents experiments realitzats amb el mateix nivell de radiació i la mateixa densitat de cultiu:

1) Les taxes d'eliminació són més altes en un tanc amb renovació continua d'aigua que té una elevada concentració de CO₂, procedent dels peixos, que en un tanc amb renovacions puntuals.

2) Hi ha diferències en el creixement d'*Ulva ohnoi* cultivada amb diferents cabals de renovació d'aigua (2, 4 i 7 L h⁻¹) i amb un flux d'entrada de N i P no limitant.

Comparant la intensitat lumínica s'ha observat que l'eliminació de N i P augmenta amb la irradiació en el rang de intensitats treballat.

Les taxes d'eliminació amb densitats de cultiu entre 0,8 i 1,2 Kg m⁻², molt properes a l'òptima d'1 Kg m⁻², augmenten amb la densitat en el cas de N però no passa el mateix en el cas de P. Tampoc hi ha diferències en el creixement. Sembla que l'alga té la tendència a d'acumular en N quan disminueix la irradiació rebuda a causa de l'auto-ombreig.

En monitorar els tancs d'algues s'ha comprovat que l'amplitud de les oscil·lacions dia-nit del pH i de la concentració de l'oxigen dissolt augmenten quan augmenta el nivell d'irradiació. El comportament d'aquests dos paràmetres podria ser un indicador de la taxa de creixement i eliminació de nutrients que es produeix a dins del tanc al llarg del cultiu.

S'estima que en un RAS associat a un cultiu d'algues l'aportació d'oxigen dissolt per metre quadrat d'un tanc d'*Ulva ohnoi*, amb una densitat de cultiu de 0,8 Kg m⁻² i un nivell d'irradiació de 280 µmol fotons m⁻² s⁻¹, és de 0,67 g O₂ m⁻² d⁻¹ i que els peixos aporten al voltant de 2,4 g CO₂ m⁻² d⁻¹ als tancs d'algues.

5. Bibliografia

- Abreu, M. H., Pereira, R., Yarish, C., Buschmann, A. H., Sousa-Pinto, I. (2011). IMTA with *Gracilaria vermiculophylla*: productivity and nutrient removal performance of the seaweed in a land-based pilot scale system. *Aquaculture*, 312:, 77-87 pp.
- Alabi, A., Chiesa, M., Garlisi, C., Palmisano, G. (2015). Advances in anti-scale magnetic water treatment. *Environmental Science: Water Reserch & Technology*, 1: 408-425 pp.
- Angell, A., Mata, L., de Nys, R., Paul, N. (2015). Indirect and direct effects of salinity on the quantity and quality of total amino acids in *Ulva ohnoi* (Chlorophyta). *Journal Of Phycology*, 51: 536-545 pp.
- APHA. (1992). APHA Method 4500-NO₃: Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 552.
- APROMAR,. (2014). Estudio general: Una primera aproximación al sector de las macroalga. 4-17 pp. Cádiz: APROMAR.
- Bird, M., Wurster, C., de Paula Silva, P., Bass, A., de Nys, R. (2011). Algal biochar - production and properties. *Bioresource Technology*, 102: 1886-1891.
- Bolton J., Robertson-Andersson D., Shuuluka D., Kandjengo L. (2009). Growing *Ulva* (Chlorophyta) in integrated systems as a commercial crop for abalone feed in South Africa: a SWOT analysis. *J Appl Phycol* 21: 575-58 pp.
- Bain, J. i Proctor, M. (1980). The requeriments of aquatic requirement of aquatic bryophytes for free CO₂ as an inorganic carbón source: some experimental evidence. *New Phytologist*, 86: 393-400 pp.
- Brattenborg, N. (2016). Norwegian Seaweeds Network - *Dictyota dichotoma* - Tvebendel. Seaweeds.uib.no. [Consultat 14 Abril 2016] Disponible a: <http://seaweeds.uib.no/?art=163>
- Coronado, I. i Rodríguez, S. (2014). Carboniferous auloporids from the Iberian Peninsula: palaeocology, diversity, and spatio-temporal distribution. *Journal Of Iberian Geology*, 40.
- Cole, A., de Nys, R., Paul, N. (2014). Removing Constraints on the Biomass Production of Freshwater Macroalgae by Manipulating Water Exchange to Manage Nutrient Flux. *Plos ONE*, 9: 128-135 pp.
- Copertino, M., Tormena, T., Seeliger, U. (2008). Biofiltering efficiency, uptake and assimilation rates of *Ulva clathrata* (Roth) J. Agardh (Clorophyceae) cultivated in shrimp aquaculture waste water. *J Appl Phycol*, 21: 31-45 pp.
- Duke C., Litaker R., Ramus J. (1989). Effects of temperature, nitrogen supply and tissue nitrogen on ammonium uptake rates of the chlorophyte seaweeds *Ulva curvata* and *Codium decorticatum*. *Journal of Applied Phycology*, 25: 113-120 pp.
- Ferrer Garcia, J. Composició de l'alga *Ulva ohnoi*: efectes de les condicions de cultiu. Treball final de grau, UPC, Escola Superior d'Agricultura de Barcelona, en procés d'avaluació.
- Friedlander, M. (1992) *Gracilaria conferta* and its epiphytes: The effect of culture conditions on growth. *Botanica Marina*, 35: 423-428 pp.
- Friedlander, M. i Levy, I. (1995) Cultivation of *Gracilaria* in outdoor tanks and ponds. *Journal of Applied Phycology*, 7: 315-324 pp.
- Grasshoff, K., Ehrhardt, M., Kremling, K., Anderson, L. (1999). Methods of seawater analysis. Weinheim: Wiley-VCH. 4-88 pp.

- Lee, R. (2008). *Phycology* (4th ed., pp. 24-26). Cambridge [England]: Cambridge University Press.
- Lobban, C. S. i Harrison, P. J. (1994). *Seaweed ecology and physiology*. Cambridge University Press. Cambridge. 366 pp.
- Longstaff, B., Kildea, T., Runcie, JW., Cheshire, A., Dennison, WC., Hurd, C, Kana T., Raven, JA. (2002). An in situ study of photosynthetic oxygen exchange and electron transport rate in the marine macroalga *Ulva lactuca* (Chlorophyta). *Photosynthesis Research*, 74: 281-293 pp.
- Lüning, K. (1990) *Seaweeds: Their environment, biogeography and ecophysiology*. John Wiley and sons. Inc. Interscience. 527 pp.
- Mata, L., Magnusson, M., Paul, N., de Nys, R. (2015). The intensive land-based production of the green seaweeds *Derbesia tenuissima* and *Ulva ohnoi*: biomass and bioproducts. *J Appl Phycol*, 28: 365-375 pp.
- Murthy, M., Rao, AS., Faldu, P. (1988) Invertase and total amylase activities in *Ulva lactuca* from different tidal levels, under desiccation. *Botanica Marina*, 31: 53-56 pp.
- Neori, A., Chopin, T., Troell, M., Buschmann, A. H., Kraemer, G. P., Halling, C., Yarish, C. (2004). Integrated aquaculture: rationale, evolution and state of the art emphasizing seaweed biofiltration in modern mariculture. *Aquaculture*, 231: 361-391.
- Neori A. i Msuya E. (2008). Effect of water aeration and nutrient load level on biomass yield, N uptake and protein content of the seaweed *Ulva lactuca* cultured in seawater tanks. *Journal of Applied Phycology*, 20: 1021-1031 pp.
- Neveux, N., Yuen, A., Jazrawi, C., Magnusson, M., Haynes, B., Masters, A. (2014). Biocrude yield and productivity from the hydrothermal liquefaction of marine and freshwater green macroalgae. *Bioresource Technology*, 155: 334-341.
- Oca, J., Klimatis, N., Pintado, J., Cremades, J., Jiménez, P., Masaló, I. (2016). Growth and nutrient uptake of the seaweed *Ulva ohnoi* integrated in a *Solea senegalensis* recirculating System: influence of light, stocking density and CO₂. *Aquaculture europe 2016*. 22-23 Setembre, Edimburg. Book of abstracts: 714-715 pp.
- Pedersen, A., Kraemer, G., Yarish, C. (2004) The effects of temperature and nutrient concentrations on nitrate and phosphate uptake in different species of *Porphyra* from Long Island Sound (USA). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 312: 235-252 pp.
- Silverside, A. (2016). *Phycodrys rubens* (images of British biodiversity). Bioref.lastdragon.org. [Consultat 15 Abril 2016] Disponible a: http://bioref.lastdragon.org/Rhodophyta/Phycodrys_rubens.html
- Smith, G. (1947) On the reproduction of some Pacific Coast species of *Ulva*. *American Journal Botany*, 34: 80-87.
- Soto, D. (2009). Integrated mariculture: a global review (No. 529). Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO).
- Timmons, M. i Ebeling, J. (2002). *Recirculating aquaculture systems*. Ithaca, NY: Cayuga Aqua Ventures.
- Tormo Molina, R. (2016). *Plantas y Hongos*. Plantasyhongos.es. [Consultat 14 April 2016] Disponible a: <http://www.plantasyhongos.es/>
- Wang, Q., Dong, S., Tian, X., Wang F. (2007). Effects of circadian rhythms of fluctuating temperature on growth and biochemical composition of *Ulva pertusa*. *Hydrobiologia*, 586: 313-319 pp.

Yokoyama H. i Ishihi Y. (2010). Bioindicator and biofilter function of *Ulva* spp. (Chlorophyta) for dissolved inorganic nitrogen discharged from a coastal fish farm – potential role in integrated multitrophic aquaculture. *Aquaculture* 310: 74-83 pp.